

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOPANKREATOBİLİER TÜMÖRLERDE DÜZENLEYİCİ

T LENFOSİTLER VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

Uzm. Dr. HALİL HAKAN ÖZGÜR

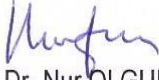
Tez Danışmanı: Prof. Dr. SAFİYE AKTAŞ

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA TEZİ

İZMİR 2014

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD- 2009970218

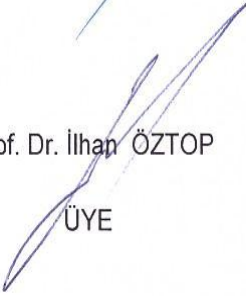
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi **Halil Hakan ÖZGÜR**,
“HEPATOPANKREATOBİLİER TÜMÖRLERDE DÜZENLEYİCİ T LENFOSİT
LER VE PROGNOSTİK ÖNEMİ” konulu Doktora tezini 25. 03. 2014 tarihinde
başarı ile tamamlamıştır.


Prof. Dr. Nur OLGUN

BAŞKAN


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
ÜYE


Prof. Dr. Özgül SAĞOL
ÜYE


Prof. Dr. İlhan ÖZTOP
ÜYE

Doç. Dr. Aydan ÇELEBİLER


ÜYE

Prof. Dr. Uğur YILMAZ

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Zekiye ALTUN

YEDEK ÜYE

ÖN BÖLÜM	i
İçindekiler.....	i
Tablo Dizini.....	VI
Şekil Dizini.....	VI
Resim Dizini.....	VI
Figür Dizini.....	VII
Grafik Dizini.....	VII
Kısaltmalar.....	VIII
Teşekkür.....	IX
ANA BÖLÜM	1
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Bağışıklık Sistemi.....	5
2.1.1.İmmünregulasyon.....	5
2.1.2.Th1 ve Th2 Hücrelerinin Gelişimi.....	7
2.1.3.Düzenleyici T Hücreleri (T_{reg}).....	7
2.1.4. T_{reg} Hücrelerinin Sınıflandırılması.....	8
2.1.5. T_{reg} Hücrelerinin Etki Mekanizması.....	10
2.1.6. T_{reg} Hücrelerinin Karakterizasyonu.....	11

2.1.7. T_{reg} Hücreleri ve Kanseri İlişkisi.....	13
2.2.SAFRA KESESİ.....	14
2.2.1.Anatomi ve Histoloji.....	14
2.2.2.Bilier Trakt Kanseri.....	14
2.2.3. Risk Faktörleri.....	15
2.2.4.Patolojik Görünüm.....	16
2.2.5.Moleküler Görünüm.....	16
2.2.6.Tanısal Modalitelerde Gelişmeler.....	17
2.2.7.Stageleme.....	18
2.2.8.Cerrahi tedavi.....	21
2.2.9. Adjuvan Kemoterapi.....	22
2.2.10.Radyoterapi.....	22
2.2.11.Moleküler Hedeflenmiş Tedavi.....	23
2.2.12.Prognoz.....	23
2.3.PANKREAS.....	24
2.3.1.Pankreas anatomi ve fizyolojisi.....	24
2.3.2.Pankreas organ gelişimi.....	24
2.3.3.Pankreatik Kanseri.....	25
2.3.4.Moleküler Karsinogenez.....	25
2.3.5.Diğer Genler.....	26
2.3.6.Metilasyon Anormallikleri.....	26
2.3.7.Gen Ekspresyonu.....	26
2.3.8.Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez.....	27

2.3.9.Morfoloji.....	27
2.3.10.Pankreatik Kanserde Prognostik faktörler.....	29
2.3.11.Pank. K.de Prognozu etkileyen faktörler ve tedavi Yaklaşımları.....	31
2.4. KARACİĞER.....	34
2.4.1.Hepatosellüler Karsinom (HCC).....	34
2.4.2.Patogenez.....	35
2.4.3.Morfoloji.....	36
2.4.4.Klinik Özellikler.....	37
2.4.5.Tedavi.....	38
2.4.6.Prognostik Parametreler.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	42
3.1.Araştırmanın Tipi.....	42
3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	42
3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	42
3.4.Araştırmanın Materyali.....	42
3.5.Araştırmanın Değişkenleri.....	42
3.6.Verı Toplama Araçları.....	43
3.6.1.Araç ve Gereçler.....	43
3.6.1.1.Tez çalışmasında kullanılan gereçler.....	43
3.6.1.2.Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	44
3.7. YÖNTEMLER.....	45
3.7.1.Genel İlke.....	45
3.7.2.Uygulama basamakları.....	46

3.8.Araştırma planı ve takvimi.....	48
3.8.Verilerin değerlendirilmesi.....	48
3.8.1.İmmünohistokimyasal verilerin değerlendirilmesi.....	48
3.8.2.İstatistiksel Verilerin değerlendirilmesi.....	49
3.9.Araştırmanın Sınırlılıkları.....	49
3.10.Etik Kurul Onayı.....	49
4.BULGULAR.....	54
4.1.Safra Kesesi kanser olgularına genel bakış.....	54
4.2.Safra kesesi kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular.....	55
4.3.Safra kesesi kanser olgularında T hücre, Nötrofil ve Plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması.....	56
4.4.Safra kesesi kanser olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar	59
4.5.Safra kesesi kanser olgularında İntratümöral Foxp3 Prognoz ilişkisi.....	60
4.6.Pankreas olgularına genel bakış.....	62
4.7.Pankreatik kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular.....	63
4.8.Pankreatik kanser olgularında intratümöral T lenfosit, nötrofil ve plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması.....	64
4.9.Pankreas kanser olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar.....	66
4.10.Pankreatik kanserde İntratümöral Foxp3 Prognoz ilişkisi.....	67
4.11.Karaciğer kanser olgularına genel bakış.....	69
4.12.Karaciğer kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular.....	70
4.12.1.Karaciğer kanser olgularında T hücre, Nötrofil ve Plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması.....	72

4.13.Karaciğer olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar.....	73
4.14.K. kanserde İntratümöral Foxp3 Prognoz ilişkisi.....	73
TARTIŞMA.....	75
6. KAYNAKLAR.....	82

TABLO DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. T _{reg} Hücrelerin Genel Sınıflaması.....	9
Tablo 2. S.K. karsinomunda TNM sınıflaması (AJCC-2010).....	19
Tablo 3. Pankreas tümörlerinin TNM sınıflaması (AJCC, 2010).....	30
Tablo 4. Hepatosellüler Karsinomda TNM klasifikasyonu, 2008.....	40
Tablo 5. S. K. kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları	55
Tablo 6. S. K. kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları.....	56
Tablo 7. Safra Kesesi olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon W).....	58
Tablo 8. P. kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları.....	63
Tablo 9. P. kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları.....	64
Tablo 10. Pankreas olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon W).....	65
Tablo 11. Karaciğer kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları	70
Tablo 12. Pankreatik kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları.....	71
Tablo 13. Karaciğer olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon W).....	71

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. CD4 ⁺ T hücrelerinin sınıflandırılması.....	8
Şekil 2. T _{reg} Hücrelerin Genel Etki Mekanizmaları.....	11
Şekil 3. Treg'lerin gelişim ve fonksiyonu.....	12
Şekil 4. Avidin-biotin kompleks boyama yönteminin şematik gösterimi.....	45

RESİM DİZİNİ

Resim No	Sayfa No
Resim 1,2. S.K. kanser olgusunda Foxp3+ T hücreler (x10,x40).....	50
Resim 3,4. P. kanser olgusunda Foxp3+ T hücreler (x10,x40).....	50
Resim 5,6. K. kanser olgusunda Foxp3+ T hücreler (x10,x40).....	50
Resim 7. Safra Kesesi kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10).....	51
Resim 8. Pankreas kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10).....	51
Resim 9. Karaciğer kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10).....	51
Resim10. Safra Kesesi kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10).....	52
Resim11. Pankreas kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10).....	52
Resim12. Karaciğer kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10).....	52
Resim 13,14. 2 ayrı S.K olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10,x40).....	53
Resim 15,16. 2 ayrı P. olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10,x40).....	53
Resim 17,18. 2 ayrı K. olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10).....	53

GRAFİK DİZİNİ

Grafik No	Sayfa No
Grafik1.S.K. kanser olgularında inttm Foxp3 yüksek olanların sağ kalım grafiği.....	62
Grafik 2. S. K. kanser olgularında, yüksek nötrofil ve düşük plazma hücre yoğunluğu sağ kalım grafiği.....	62
Grafik 3. Yüksek intratümöral Foxp3 oranlarına sahip olguların, sağ kalım grafiği.....	68
Grafik 4. İntratümöral yüksek nötrofil ve düşük plazma hücre yoğunluğu sağ kalım bulguları.....	68

Grafik 5. K. kanserinde Yüksek Foxp3 yoğunluğuna göre sağ kalım bulguları	74
---	----

FİGÜR DİZİNİ

Figür No	Sayfa No
-----------------	-----------------

Figür 1. S.K.Tümör evrelendirilmesinin histolojik görünümü.....	20
--	----

KISALTMALAR

Treg	: Regulator T lenfosit
CTLA-4	: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
IL-10	: İnterlökin-10
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
Foxp3	: Forkhead Box P3
CD 4-8	: Cluster of Differentiation 4-8
Th-1	: Tip 1 T Helper
MHC	: Major Histocompatibility Complex
IFN-γ	: İnterferon gamma
ILT-3-4	: Ig benzeri transkript
GITR	: Glicocorticoid induced tumor necrosis factor reseptör ilişkili protein
NFAT	: Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	: nuclear factor of activated B-cells
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor
Cox2	: Siklooksijenaz 2
PET	: Pozitron Emisyon Tomografi
h TERT	: Human telomerase reverse transcriptase
pdx-1	: Pancreatik and duodenal homeobox gene 1
GLUT	: Glucose transporter
PanIN	: Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi

TEŞEKKÜR

DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Doktora Programı dahilinde tezimin kurgulanması, çalışmaların planlanması, malzemelerin temini, laboratuvar çalışmalarının planlanması ve yürütülmesi, literatür bilgilerinin yorumlanmasında bilimsel ve moral olarak büyük desteğini ve katkısını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Safiye Aktaş'a, çalışmanın fikir babası eski tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Yılmaz'a, diğer danışman hocalarım Prof.Dr. İlhan Öztopçu ve Prof Dr. Özgül Sağol'a, ders döneminde bilimsel yönden gelişmemde katkıları olan tüm Temel Onkoloji ve Klinik Onkoloji hocalarına, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan doktora arkadaşlarım Pınar Erçetin, Sait Murat Doğan, Doç. Dr. A.Güliden Diniz Ünlü ve Uzm. Dr. Nüket Eliyatkin'a, doktora döneminde büyük anlayışı ve cesaret verici tavrı ile destek veren hocam Prof. Dr. A. Ali Küpeliolu'na, olgularını bana vererek çalışmaya can veren Doç.Dr. Ragıp Ortaç'a, tez çalışmamın her aşamasında sevgileri ve özverileri ile bana büyük destek veren sevgili eşim Şule Özgür, büyük oğlum Mustafa Mert Özgür ve küçük oğlum Ege Özgür ile bütün aileme teşekkür ederim.

Uzm. Dr. H. Hakan Özgür

İzmir, 2014

HEPATOPANKREATOBİLİER TÜMÖRLERDE D ZENLEY C  T LENFOS TLER VE PROGNOST K  NEM 

Uzm. Dr. H. Hakan  zg r

Yazışma Adresi: Özel G NE  Patoloji Laboratuvar  İZMİR

ÖZET

Amaç: Prognostik olarak zayıf gidişli Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğer kanser olgularında regulator T hücreler (Treg), CD4 T hücreler ve CD8 T hücrelerin intratümöral ve peritümöral dağılımlarının bulunması, Treg hücrelerin intratümöral miktarlarının prognostik parametrelerle ve sağ kalımla olan ilişkilerinin belirlenmesi.

Yöntem: Radikal cerrahi rezeksiyon sonrası elde edilen 20 Safra Kesesi, 25 Pankreas ve 8 Karaciğer kanser olgularının tümör parafin bloklarına ait kesitlerinin Foxp3, CD4 ve CD8 monoklonal antikorları ile immünhistokimyasal (IHK) olarak boyanması ve sonrasında histopatolojik ve klinik prognostik parametreler elde edilmesi ile oluşturulmuştur. Daha sonra intratümöral ve peritümöral alanlardaki Foxp3, CD4 ve CD8 yoğunlukları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Son olarak, intratümöral Foxp3 miktarları prognostik parametrelerle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 0,05'in altındaki p değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular: Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğer kanser olgularının her    nde de Foxp3, CD4, CD8 miktarlarının peritümöral alanlarda, intratümöral alanlara göre daha yoğun miktarlarda bulunduğu görülmüştür (Hepsi için $p<0,05$). Her    nde de, intratümöral Foxp3/CD4 pozitivite oranı, peritümöral alana göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur (Hepsi için $p<0,05$). Safra Kesesi kanser olgularında ileri evre ile yüksek CD4+, CD8+ ve Foxp3+ ($p<0,05$), yüksek Foxp3 pozitivitesi ile az diferansiye tümörler arasında ($p=0,023$), Yüksek Foxp3 ve CD8 pozitivitesi ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında ($p<0,05$), CD8 pozitivitesi ile perinöral invazyon varlığı ($p=0,028$) arasında anlamlı bir ilişki izlenmektedir. Pankreas kanser olgularında, yüksek intratümöral Foxp3 pozitivitesi 75 yaş üzeri olgularda daha yüksek oranda izlenmiştir ($p=0,046$). Karaciğer kanser olgularında, intratümöral Foxp3 yüksekliliği ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında belirgin bir ilişki izlenmektedir ($p=0,040$). Her üç kanserde de intratümöral Foxp3 pozitivite miktarı ile prognostik olarak kötü olarak değerlendirilen olgular arasında belirgin ilişki izlenmektedir ($p<0,05$), hastalıksız sağ kalım ile Safra Kesesi ve Panreas olgularında ilişki bulunurken ($p<0,05$), Karaciğer kanser olgularında ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Tümör infiltre eden Foxp3/CD4 Treg hücrelerin sıklığı tumor mikroçevresinde peritümöral Alana gore intratümöral alanda önemli oranda daha yüksektir. Sonuçlarımız, antitumor immün yanıtların baskılanmasında CD4 Treg hücrelerin önemli rol n  desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Treg hücreler, CD4 ve CD8 T hücreler, Safra Kesesi kanseri, Pankreatik kanser, Karaciğer kanseri

REGULATORY T CELLS AND THEIR PROGNOSTIC VALUE IN

HEPATOPANCREATOBILIARY TUMOURS

H.Hakan Özgür, MD, Pathologist

Corresponding Address: Güneş Pathology Laboratory , İzmir

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine the prognostic values of intratumoral and peritumoral distributions of Foxp3+ Treg cells, CD4+ T cells and CD8+ T cells in cancer cases of gallbladder, pancreas and liver.

Methods: This study included 20 patients with gallbladder cancer, 25 patients with pancreatic cancer and 8 patients with liver cancer after radical surgery resection. The paraffin embedded archive tissue sections of these cases were immunohistochemically stained by Foxp3, CD4 and CD8 monoclonal antibodies and afterwards we evaluated all results with histopathological and clinical prognostic parameters. Then, we compared the intensity differences of Foxp3, CD4 ve CD8 between frequencies intratumoral and peritumoral areas statistically. Finally, Foxp3 levels were compared statistically with prognostic parameters. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results: Foxp3, CD4 and CD8 expression levels were significantly higher in peritumoral areas than in intratumoral areas in patients with gallbladder, pancreas, liver cancers ($p<0,05$). Foxp3+/CD4+ were significantly higher in intratumoral areas than in peritumoral areas in all three cancer types ($p<0,05$ for all). There were a statistically significant associations between high positivity of Foxp3, CD4 and CD8 and advanced stage ($p<0,05$), between high positivity of Foxp3 and poorly differentiate tumors, between high positivity of Foxp3 ($p=0,023$), CD8 and presence of lymphovascular invasion ($p<0,05$), between high positivity of CD8 and presence of perineural invasion in patients with gallbladder cancer ($p=0,028$). There was a significant association between high positivity of Foxp3 and advanced age (over 75 years) in patients with pancreatic cancer ($p=0,046$). There was a association between high positivity of Foxp3 and presence of lymphovascular invasion in patients with liver cancer ($p<0,05$). There was a significant association between high positivity of Foxp3 and adverse prognosis according to clinical characteristics in patients with gallbladder, pancreas and liver cancers. Gallbladder and pancreas cancer patients with high positivity of Foxp3, had a shorter disease free survival ($p<0,05$).

Conclusion: The intensity of tumor-infiltrating FOXP3/CD4 Treg cells was significantly higher in the intratumoral area than peritumoral area within the tumor microenvironment. Our results had supported to significant role of CD4 Treg cells in suppressing antitumor immune responses.

Key Words: Treg cells, CD4 T cells, CD8 T cells, gallbladder cancer, pancreatic cancer, liver cancer

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Regulatör T hücreler (Treg) insan periferel kanında hücreseel immünitenin önemli bir üyesi olan CD4+ T hücrelerin % 5-10'unu oluşturan hücre grubudur. Treg hücreler self ve nonself (kendine ait ve yabancı) antijenlere karşı T hücre ilişkili konakçı immün yanıtları baskılayan immün sistemin önemli bir komponentidir. Treglerin otoimmün hastalıklar ve kansere karşı immün yanıtların baskılanmasında önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Treg hücreler immünsupresif etkilerini invitro CTLA-4 aracılığıyla hücre-hücre kontağı ve IL-10 ve TGF- β ekspresse ederek sitokin aracılığı ile gerçekleştirirler. IL2 sitokini, inhibitör molekül CTLA-4 kadar IL-2 reseptör α zincir CD25'in yüksek seviyelerini ekspresse eden CD4+ Treglerin gelişim, homeostasis ve fonksiyonu için gereklidir. Regulatör T hücreler insan tümörlerinde sıklıkla bulunmaktadır. Başta malign melanom olmak üzere pek çok insan malign tümörlerinde intratümöral ve peritümöral alanlarda Foxp3+CD4 Treg hücreler sayılmış ve peritümöral alanlarla karşılaştırıldığında intratümöral alanlarda Foxp3+CD4 Treg hücrelerde önemli oranda bir artış bulunmuştur. Buna ek olarak, bazı hastalar ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinden tespit edilen Foxp3+CD4 Treg hücre miktarları tümör alanlarındakinden 3-5 kat daha az bulunmuştur. Bu bulgular Foxp3 ekspresyonu gösteren CD4 hücrelerin tümörlerde selektif olarak toplandığını ve onların periferel kandaki sıklıklarının tümör mikroçevresini uygun bir şekilde yansıtmadığı belirtilmiş ve tümör infiltre eden CD4 Treg hücre popülasyonunun Foxp3 ekspresyonunun gösterilmesi ile doğru olarak tanımlanabileceği gösterilmiştir. Sonuçta çalışmalar , Foxp3 ekspresyonunun, tümör mikroçevresinde insan Treg hücreler için anahtar bir biyolojik belirteç olduğunu göstermiştir. Akciğer, gastrointestinal sistem, meme, lenfoma, over ve melanom gibi kanserlerde tümör mikroçevresinde artmış Treg'lerin zayıf prognoz ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Kanser mikroçevresi ve periferel kanda Treg'leri yoketmeyi hedefleyen yaklaşımların normal immün yanıtları artırabileceği ve iyileştirebileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur.

Çok sayıda çalışmalarda Kolorektal, Hepatosellüler, Renal, Gastrik, Ovaryan, Nazofarengeal kanser gibi farklı kanser tiplerinde yüksek nötrofil miktarlarının zayıf klinik gidiş ile ilişkilenmiş olduğu gösterilmiştir. Çok sayıda çalışmalarda Kolorektal, Hepatosellüler, Renal, Gastrik, Ovaryan, Nazofarengeal kanser gibi farklı kanser

tiplerinde yüksek nötrofil miktarlarının zayıf klinik gidiş ile ilişkilenmiş olduğu gösterilmiştir. İn-vitro ve in-vivo hayvan modellerinin bir kısmında nötrofillerin tümör mikroçevresinde tümör progresyonuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir.

Safra Kesesi karsinomu, batı ülkelerinde yılda 3.320 ölümle seyrek görülen bir kanser olmakla beraber , insidansı giderek artış göstermektedir. Bu sayı Japonya’da yılda 17.599 ile kanser ölümlerinin yaygın bir nedenini oluşturmaktadır. Genellikle seyrek vakalarda operasyon sırasında keşfedilir. Prognozu cerrahi ile bile yüksek rekürrens oranlarıyla yetersiz kalır. Yaş, cinsiyet, tümör çapı, grade, diferansiasyon, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon önemli prognostik parametrelerdir.

Pankreasın İntilratif Duktal Adenokarsinomu bütün pankreatik malignitelerin % 85-90’ nını oluşturur. En öldürücü kanserlerden biridir. En sık 60-80 yaşları arasında görülür. Erkeklerde hafifçe artmış insidansa sahiptir. Risk faktörleri diabetes mellitus, sigara içimi, ailede pankreatik kanser öyküsü ve yüksek yağlı diyetdir. Cerrahi rezeksiyon yeterliliği, lenf nodu metastaz durumu, cerrahi sınırların durumuurumu prognozda önemli faktörlerdir.

Hepatosellüler Karsinom, vakaların % 75-90’ında siroz gidişi sırasında oluşan karaciğerin en yaygın malign primer tümörüdür . Siroz varlığı kadar hepatosellüler karsinom gelişimi de Hepatit B ve C viral enfeksiyonları da rol oynar . Diğer risk faktörleri Aflatoksin, Thorotrast ve östrojen stereroidleridir. Vasküler invazyonun yokluğu, zeminde siroz olmayışı, küçük tümör çapı (<3-4 cm) ve komplet rezeksiyon veya ablasyon iyi bir prognozun en önemli faktörleridir .

Çalışmamız, tümör mikroçevresinde Treg’lerin dağılımı ile ilgili sınırlı sayıda araştırmaya sahip olan, Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğer kanser olguları üzerinde yapılmıştır.

Çalışmanın amaçları:

- Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğer kanserlerine ait kesitlerde intratümöral ve peritümöral alanlarda Foxp3, CD4, CD8 T hücreler, nötrofil ve plazma hücre miktarları İHK olarak değerlendirilmiştir.
- Bulunan değerler, her üç kansere ait prognostik parametreler, hastalıksız sağ kalım gün sayısı, yaşam durumu ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Bağıışıklık Sistemi

Bağıışıklık sistemini oluşturan birinci grup, yanıtı antijenin yapısından bağıımsız olarak birçok antijene karşı ortak olarak kullanılabilen doğal bağıışıklık sistemi yanıtıdır. Burada özel bir antijene karşı özgülük söz konusu değildir. Midemizin asit pH'sının patojenlerin öldürölmesi, üzerindeki sinyalleri uygun olmayan hücreleri öldüren nötrofiller, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreleri, kompleman sistem proteinleri gibi birçok mekanizma da doğal bağıışıklık sisteminin bir parçasıdır (1).

Bağıışıklık sistemi yanıtlarının diğlerleri ise belli antijenlere özgül olarak gelişir ve edinilmiş bağıışıklık sistemi olarak sınıflandırılır. Edinilmiş bağıışıklık sistemi de hüııoral (kana salgılanan maddeleri içeren) ve hüıresel bağıışıklık olarak bir daha ikiye ayrılır. Hüııoral bağıışıklık sistemi, antikorları salgılayan B hüırelerinden oluşur. Hüıresel bağıışıklık ise hüırelerin bizzat kendilerinin öldürme işlemine katıldığı $CD8^+$ T hüıreleri ve bütün bu mekanizmaları yöneten $CD4^+$ T hüırelerinden oluşur (1).

Vücudumuz belli genleri kırıp kullanarak (mutasyonların da katkısıyla) sınırsız yakın çeşitlilikte antikor (B hüıre reseptörü olarak da görev yapar) veya T hüıre reseptörleri oluşturularak, her türlü antijeni tanıyacak çeşitlilikte B ve T hüıreleri üretir. Bu sürecin sonunda her B ve T hüıresi sadece bir antijeni tanıyacak bir adet reseptör çeşidi taşır. Eğer gelen patojenin üzerinde bu antijen varsa o antijeni tanıyan hüıre grubu aktifleşir ve bağıışıklık yanıtını yönetir (klonal seçim mekanizması), bu antijenleri tanımayan hüıreler ise uyarılmazlar. Bu kadar geniş bir çeşitliliğe ulaşmanın bir de bedeli vardır, üretilen hüırelerin vücuda ait yapılara bağılanıp saldırarak reseptörlere sahip olmaları tehlikesi. Bu da bu hüırelerin üretildiğı organlarda vücuda ait tüm antijenlerin bu hüırelere sunulması ve bunlara saldırma potansiyeline sahip olanların çeşitli mekanizmalarla susturulmaları ile sağlanır. Bu hüıreler durdurulamazlarsa bağıışıklık hüırelerinin vücudun kendi yapılarına saldırdığı çeşitli otoimmün hastalıklar ortaya çıkar (2).

2.1.1.İmmünregulasyon

İmmün sistemin ana fonksiyonu patojen veya mikroorganizmalardan enfekte olmuş hüıreleri yok etmek ve bu sırada çevre dokudaki hasarı minimal düzeyde

tutmaktır. Antijen sunan hücreler tarafından başlatılan immün yanıt, hüморal ve hücreyel bağışıklık, hücre-medyatör etkileşimleri ve immün sistemi düzenleyici sinyal iletilci fonksiyona sahip bir polipeptit olan lenfokin üretimi ile aktive edilmektedir. Bunun sonucunda sitotoksik efektör T hücreleri oluşarak antijene özgül yanıt oluşturacak antikorlar salınır. İmmün sistemin vücudun kendi antijenlerini tanıyarak zarar vermeden sadece patojen türevli enfekte molekülleri yani yabancı antijenleri yok etmesi oldukça hassas bir denge gerektirmektedir. Oluşan bu dengeli sisteme immün tolerans denir. İmmün toleransın bozulması halinde organizmanın kendi antijenlerine immün yanıt oluşturması durumunda ortaya çıkan hastalığa otoimmün hastalık denir. Bunun yanısıra immün yanıtın azalması halinde immün sistem çökebilir veya immün yanıtındaki dengesizlikler alerjiye sebep olabilir (3). Bu durumların ortaya çıkmasını kontrol ederek immünregulasyonu sağlayacak bazı sistemler mevcuttur. İmmün tolerans klonal delesyon yoluyla gerçekleşen merkezi tolerans ve periferel tolerans mekanizmalarına sahiptir (4). Merkezi toleransta T hücrelerinin timustaki gelişme sürecinde vücudun kendi antijenlerine karşı reseptör taşıyan hücreler yıkıma uğramaktadır. Böylece daha lenfositlerin olgunlaşma sürecinde negatif seleksiyon gerçekleşerek klonal bir delesyon meydana gelmektedir (5, 6). Periferel toleransta antijen sunan hücrelerin antijen sunumu sırasında ikinci bir sinyal iletilmesi bozularak klonal anerji adı verilen durum oluşturulur. Klonal anerjide sıklıkla görev yapan B7 ailesi moleküllerinin etkileşimi önem taşır. Olgunlaşmış bir dendritik hücre veya antijen sunan hücre üzerindeki B7 reseptörü ile aktif haldeki bir T hücresinin üzerindeki CD28 'in ya da *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) 'ün etkileşimi sonucunda ikincil sinyal iletilimi engellenebilmektedir (7,8). Periferel toleransın en önemli parçası olan bir diğer sistem ise düzenleyici T hücreleridir (T_{reg}). Düzenleyici T hücreler immün sistemi baskılayıcı yönde etki ederek otoimmüniteyi ve graft rejeksiyonu önlemekte olup, azalan T_{reg} fonksiyon aktivitesi ise otoimmün hastalıklara duyarlılığı arttırmaktadır. Ancak T_{reg} hücrelerinin infeksiyöz ajanlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immün cevapları module ederken anormal immünsüpresif fonksiyon göstermesi sonucunda infeksiyon veya malign durumlar da ortaya çıkabilmektedir (9,10).

2.1.2.Th1 ve Th2 Hücrelerinin Gelişimi

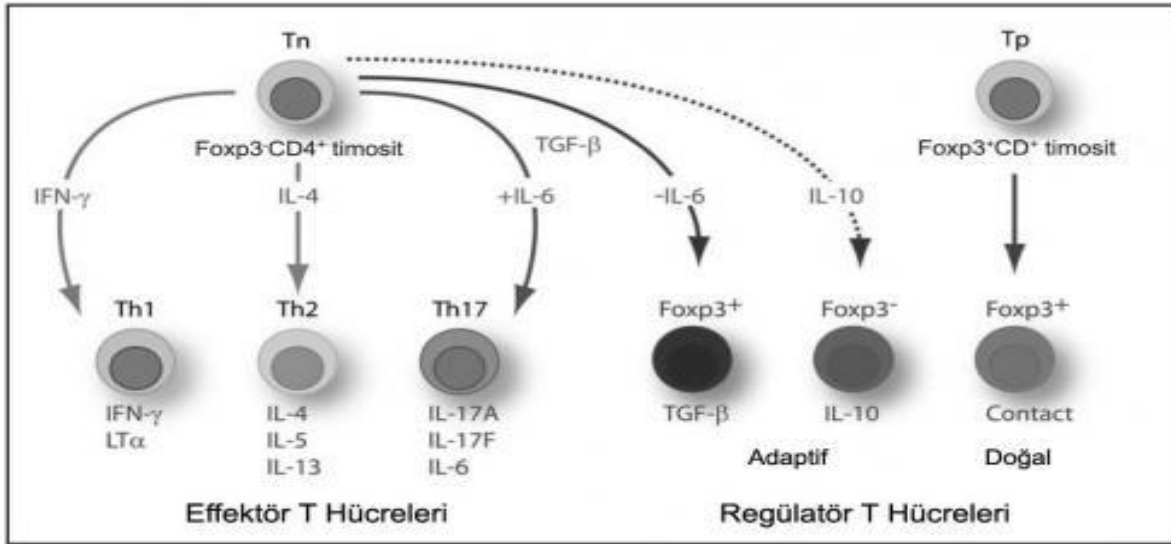
CD4⁺ T yardımcı hücreleri timüste ilk olarak naif T hücresi olarak oluşmakta ve dolaşıma verilmektedir. Bunun ardından bu hücreler antijenleri ile karşılaştıktan sonra uygun sitokin ortamı etkisiyle belli T hücre gruplarına farklılaşmaktadırlar. Yaklaşık 20 yıl önce yardımcı T hücrelerinin antijen uyarımının ardından iki farklı grup yardımcı T hücresine farklılaştığı gösterildi ve bu hücreler Th1 ve Th2 olarak isimlendirildiler . Bunun ardından değişik çalışmalarda farklı özellikler gösteren alt gruplar tanımlandı ise de bunların hiçbiri yeni bir yardımcı T hücre grubu olarak kabul görmedi. Ve ilerleyen çalışmalar, bu iki hücre grubunun, birbirinin fonksiyonunu dengeleyici olarak görev yaptıkları düşündürmüştür (11).

Naif T hücreleri kendi reseptörlerine uygun antijeni, antijen taşıyan antijen sunucu hücrenin MHC molekülü üzerinde görüp, CD3 ve CD28 kostimülasyonu da sağlandığında ve ortamda IFN-gamma sitokini veya IL-12 sitokini baskın ise Th1 hücresi olarak farklılaşırlar ve özellikle intraselüler patojenlere karşı bağışıklık yanıtında önemlidirler (2).

Th2 hücreleri ise aynı şekilde antijen uyarımının ardından ortamda IL-4 sitokininin baskınlığı varsa farklılaşırlar ve daha ziyade ekstraselüler patojenlere karşı bağışıklık yanıtında önemlidirler. Mevcut olan patojenin tipi doğal bağışıklık sisteminin ne şekilde etkileneceğini belirler ve doğal bağışıklık sisteminden salgılanan sitokinler de uygun T hücre farklılaşmasına katkıda bulunur. Uygun T hücre farklılaşmasının ardından farklılaşan T hücresinden salgılanan sitokinler de naif T hücrelerinden farklılaşmanın aynı yönde devam etmesini sağlar ve diğer T hücre grubunun farklılaşmasını inhibe eder (2).

2.1.3.Düzenleyici T Hücreleri (T_{reg})

Düzenleyici T hücreler ilk kez 1970 yılında süpresör hücreler olarak tanımlanmıştır. 1980 'lerde ise izolasyon ve tanımlanmasının zorluğundan dolayı çalışmalar bırakılmıştır. 1995 yılında Sakaguchi 'nin interleokin-2 (IL-2) reseptörü α zincirinin (*cluster of differentiation 25*, CD25) CD4⁺ T_{reg} hücreler için fenotipik bir belirteç olduğunu bulmasıyla birlikte T_{reg} hücreleri üzerine çalışmalar tekrar hız kazanmıştır (12).



Şekil 1. CD4⁺ T hücrelerinin sınıflandırılması:Ok içerisinde gösterilen sitokinler ilgili hücre grubunun farklılaşmasında görev alan sitokinleri belirtmektedir. Hücrelerin altında gösterilenler ise o hücre grubunun efektör veya regülatör fonksiyonunda rol alan etkenleri göstermektedir (2).

2.1.4. *T_{reg}* Hücrelerinin Sınıflandırılması

T_{reg} hücreleri oluşum şekillerine göre ikiye ayrılır. Direkt olarak timus kökenli olanlara doğal *T_{reg}* hücreleri denirken CD4⁺ veya CD8⁺ hücrelerden bir antijene temas sonucu oluşanlara ise uyarı kökenli ya da indüklenmiş *T_{reg}* hücreler (*iT_{reg}*) denir. *T_{reg}* hücreleri hücre tipine göre ise CD4⁺ ve CD8⁺ olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. CD4⁺ *T_{reg}* hücreleri beş grupta incelenir. Timus kökenli doğal bulunan *T_{reg}* hücreler, periferel yolla indüklenmiş *T_{reg}* hücreler, tip 1 regülatör (Tr1) ve T yardımcı 3 (Th3) hücreler ile *transforming growth factor-β* (TGF-β) / IL-10 çift pozitif CD4⁺ *T_{reg}* hücreler olarak adlandırılmakta olup farklı fenotiplere ve farklı immünsüpresif mekanizmalara sahiptirler. Ayrıca CD4⁺ *iT_{reg}* hücreler CD4⁺ T hücrelerin in vivo veya ex vivo yolla aktif hale gelmesi sonucunda süpresif etkilerini gösterebilmektedirler. Timus kökenli doğal bulunan *T_{reg}* hücreler ve periferel yolla indüklenmiş *T_{reg}* hücreler CD4⁺ CD25⁺ *forkhead box p3* (Foxp3⁺) fenotipine sahiptirler. İmmünsüpresif etkilerini invitro (CTLA4) aracılı hücre-hücre kontağı ve in vivo hücre-hücre kontağı ile IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Tr1 hücreler CD4⁺ CD25[±] Foxp3⁻ ve yüksek IL-10 fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini hücre-hücre kontağı ve IL-10 eksprese ederek sitokin

aracılı olarak gerçekleştirirler. Th3 hücreleri CD4+ CD25± Foxp3- ve yüksek TGF-β fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini sadece TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Son olarak TGF-β/ IL-10 çift pozitif CD4+ T_{reg} hücreler ise TGF-β/ IL-10 çift pozitif ve CD4+ CD25- Foxp3- fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini sadece IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. CD8+ T_{reg} hücreleri T süpresör hücreler (Ts) ve IL-10 üreten CD8+ T hücreleri olmak üzere iki grupta incelenir. Ts hücreler CD8+ CD28- fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini CTLA4 aracılı hücre-hücre kontağı yoluyla gerçekleştirirler. IL-10 üreten CD8+ T hücreleri ise CD8+ IL-10+ fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler (13,14,15,16,17). T_{reg} hücrelerin genel sınıflaması Tablo 1 'de belirtilmektedir.

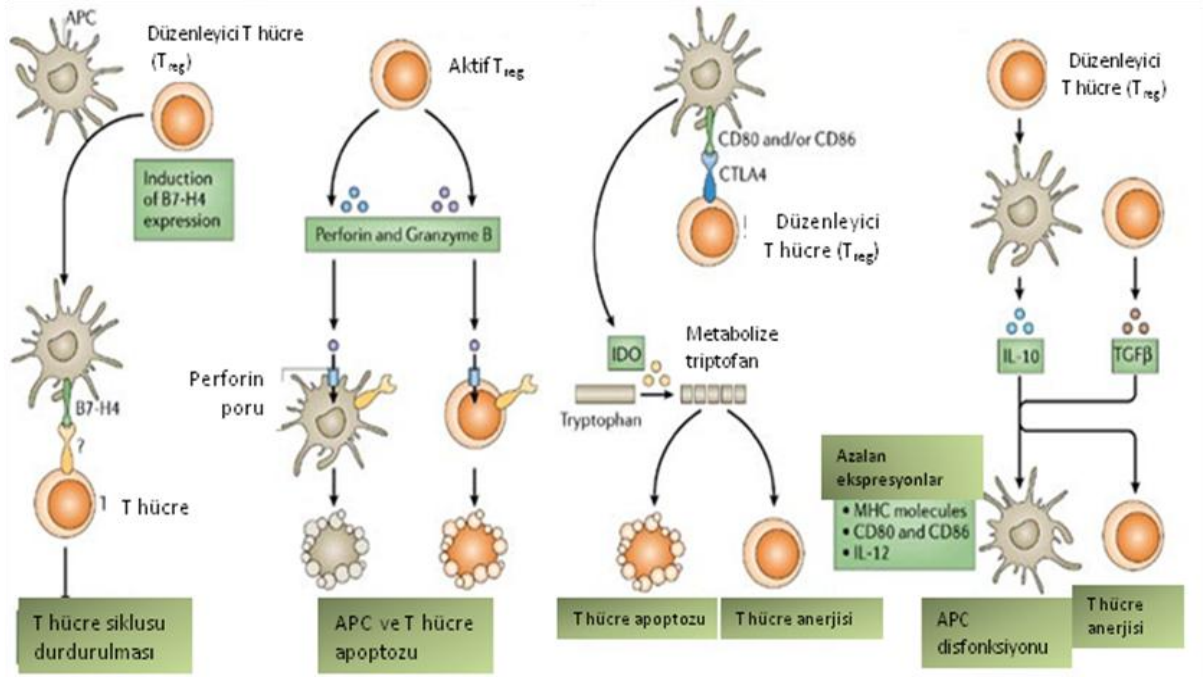
Tablo 1. T_{reg} Hücrelerin Genel Sınıflaması

T _{reg} Alt Sınıfı	Regülatör mekanizma	Eksprese edilen transkripsiyon faktörü	Fonksiyon
CD4+ CD25+ T _{reg} hücreleri	- Hücre- hücre kontağı - Sitokinler (IL-10)	Foxp3	- Otoimmün süpresyon - Yabancı antijenlerin rejeksiyonunun inhibe edilmesi - Bakteriyel infeksiyonlara karşı yanıtın inhibe edilmesi - UV- aracılı süpresyon
Tr1 hücreleri	IL-10	Foxp3 (?)	Otoimmün süpresyon
Th3 hücreleri	TGF-β		Otoimmün süpresyon
NK T _{reg} hücreleri	IL-4, IL-10, TGF-β sitotoksosite		- Tümörlerin ve viral antijenlerin eliminasyonu - Otoimmün süpresyon - UV ile indüklenen tümörlere karşı korumaya yönelik immün sistemin modüasyonu

2.1.5. T_{reg} Hücrelerinin Etki Mekanizması

Tüm timus kökenli doğal bulunan ve indüklenmiş T_{reg} hücrelerinin süpresif fonksiyonlarını göstermesi için bir T hücre reseptörü (TCR) tetiklemesine ihtiyacı vardır. T_{reg} hücrelerin efektör T hücre aktivasyonunu baskılaması ve fonksiyonu üzerine mekanizması kesin ve net olarak aydınlatılamamıştır . Ancak genel anlamda T_{reg} hücrelerin süpresif etki mekanizmasını sınıflandırmada da görüldüğü üzere hücre-hücre kontağı ve sitokin aracılı olmak üzere iki yolla gerçekleştiği belirlenmiştir. $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücreler efektör T hücre proliferasyonunu ve interferon gama (IFN γ) üretimini direk bu hücrelerle temas ederek gerçekleştirebilmektedir. Efektör T hücre üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre yüzeyindeki ($CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücre) CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda baskılayıcı etkili sinyal iletilerek efektör T hücrenin fonksiyonu inhibe edilmiş olur. T_{reg} hücrelerin efektör T hücrelerin fonksiyonunu etkilemesinde bir başka mekanizma dendritik hücre (DC) modülasyonu aracılığıyla'dır. DC üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre üzerindeki CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda indoleamin-2,3-dioksijenaz (IDO) ekspresyonu ve aktivasyonu artar. IDO triptofan aminoasidi degradasyonunda yer alan katabolik bir enzimdir. Bu nedenle triptofanın azalması sonucunda T hücrelerin delesyonuna ya da aktivite kaybına yol açmaktadır (9,13,14). *Şekil 1* 'de bu mekanizmalar şematize edilmiştir. Bu bilinen mekanizmalar dışında T_{reg} hücrelerin hücre-hücre kontağı yoluyla nasıl süpresif etki gösterdiği hala araştırılmaktadır. Hücre- hücre kontağı bağımlı sitokin bağımsız mekanizmaya karşılık in vitro çalışmalara göre Tr1 hücreleri ve Th3 hücreleri süpresif aktivitelerini IL-10 ve TGF- β immünsüpresif sitokinlerini üreterek göstermektedirler. *Şekil 2* ve *Şekil 3*'de T_{reg} hücrelerin etki mekanizması, gelişimi ile fonksiyonları izlenmektedir. T_{reg} aktivitesinde immünsüpresif sitokinlerin katkısı hedef organın doğası, inflamasyonun derecesi gibi birçok fizyolojik faktör ile etkilenebilir. IL-10 hasarı sonucu *colitis*, TGF- β bağımlı diyabet oluşumu gibi bazı otoimmün hastalıklar da ortaya çıkabilir. $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücreler *granzyme A* eksprese edebilirler. Böylece $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri perforin bağımlı mekanizma üzerinden öldürebilirler. Bunlara ek olarak T_{reg} hücreler DC olgunlaşmasını ve aktivasyonunu sitokin salınımıyla önlemektedirler. Bunun için IL-10 DC üzerindeki *major histocompatibility complex* (MHC) sınıf 2 'yi ve CD80/ CD86 ko-stimule edici moleküllerin uyarıya yanıt vermesini baskılayarak DC 'nin antijen sunma kapasitesine zarar verir. TGF- β da MHC sınıf 2'nin ekspresyonunu bozup ko-stimule edici

moleküllerin de etkinliğini önler. Ayrıca CD8+ T_{reg} hücreler de ko-stimule edici moleküllerin de etkinliğini önlemektedir. Buna ek olarak DC tarafından Ig benzeri transkript 3 ve 4 (ILT3 ve ILT4) ekspresyonunu artırırlar. ILT molekülleri Ig benzeri inhibitör reseptör ailesindendir. Fonksiyon olarak ise öldürücü hücre inhibitör reseptörleri ile ilişkilidirler. ILT nin antijen-sunan hücrelerde ligasyonu Ca²⁺ mobilizasyonunu ve tirozin fosforilasyonunu engeller. Ayrıca böyle ILT eksprese eden DC hücreleri CD4+ T hücrelerini immünsüpresif fonksiyona sahip Treg hücrelerine dönüştürebilmektedir (18,19,20).



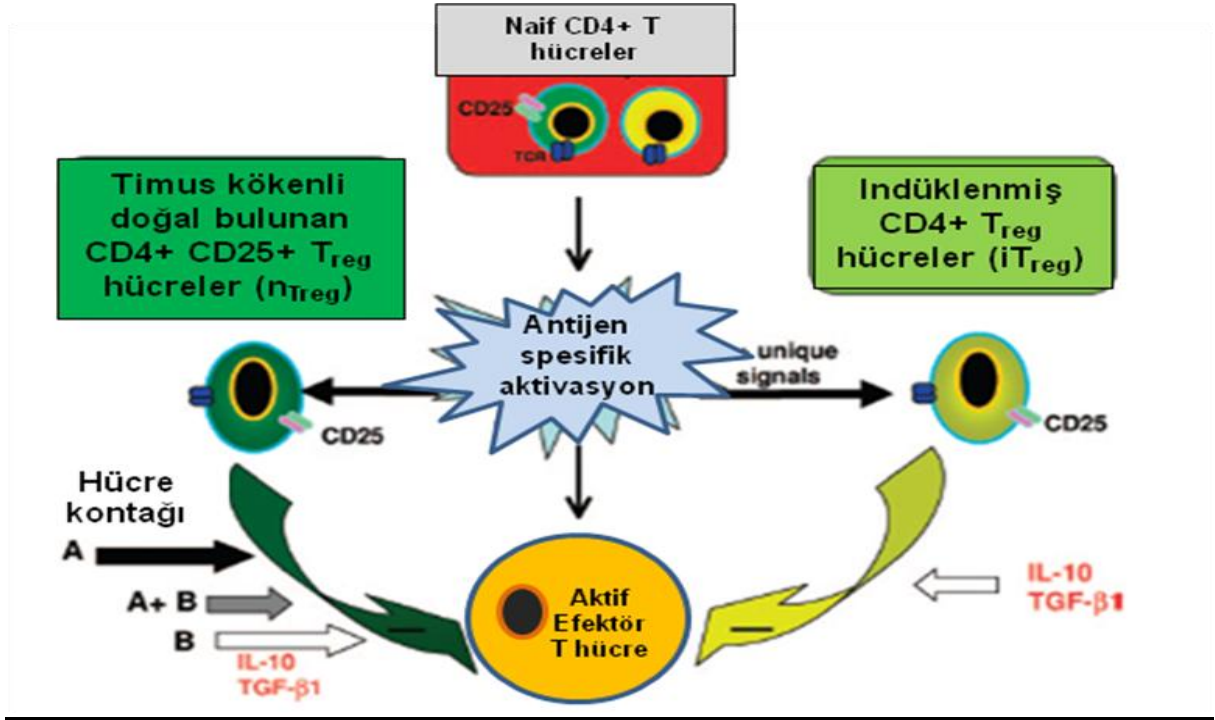
Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006; 6:295-307

Şekil 2. T_{reg} Hücrelerin Hücre Konağı ve Sitokinlerle Genel Etki Mekanizmaları

2.1.6. T_{reg} Hücrelerinin Karakterizasyonu

Timus kökenli doğal bulunan CD4+ CD25+ T_{reg} hücreler total periferik CD4+ T hücrelerin %5-10 'unu oluşturan immünsüpresif etkili T hücre popülasyonudur. CD25 ekspresyonunun yanı sıra bazı belirteçleri de eksprese ederler. Bunlar, *glucocorticoid induced tumor necrosis factor* (TNF) reseptör ilişkili protein (GITR), TNF süperailisi üyelerinden OX40 (CD134), lökositler üzerinde bulunan bir hücre adezyon molekülü olan L-selektin (CD62 ve ligandı CD62L) ve CTLA-4 (CD152) olarak adlandırılır (21, 22). Ancak bu belirteçlerin hiçbirisi spesifik bir şekilde T_{reg} hücreleri tanımlamaz. Bu

belirteçler belli derecelerde aktif T hücre alt gruplarında ve bazı antijen sunan hücreler (APC) üzerinde de eksprese edilmektedirler. Yakın zamandaki çalışmalar Foxp3 transkripsiyon faktörünün T_{reg} hücreleri tanımlayıcı özel bir belirteç olduğunu ortaya koymuştur. $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu için Foxp3 oldukça önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Foxp3 'ün fonksiyonunu kaybetmesi sonucunda gelişen mutasyonlar T_{reg} hücrelerin eksikliğine ve bundan kaynaklanan ciddi bazı otoimmün bozukluklara yol açmaktadır.



Şekil 3: Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. J Leukoc Biol, 2006; 80:458-470

T hücrelerde Foxp3 'ün ektopik ekspresyonu bu hücrelerin regülatör fenotip ve süpresif fonksiyon kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca Foxp3 bir Rel ailesi transkripsiyon faktörü olan *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) ve aktif B hücrelerinin NFκB hafif zincirlerinin hedef genlerini indüklemeye özelliklerini engellemektedir. Bunun sonucunda IL-2 ve diğer sitokin genlerinin (IFNγ, IL-4 gibi) transkripsiyonel bir baskılayıcısı özelliğini kazanır. Tüm bunlara ek olarak Foxp3 devam etmekte olan immün yanıtların kontrolü için aktif T hücrelerine negatif geri besleme yoluyla etki etmektedir (23,24).

2.1.7. T_{reg} Hücreleri ve Kansere İlişkisi

T_{reg} hücreleri konakçıyı kendi antijenlerine karşı reaktif hücreleri baskılayarak otoimmün hastalıklara karşı korur. Burdan yola çıkarak güncel araştırma konuları çoğunlukla otoimmün hastalıklarda T_{reg} hücre defektlerinin karakterizasyonu ile T_{reg} hücrelerinin bulaşıcı hastalıklar ve allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası toleranstaki rolü üzerinedir. T_{reg} hücre biyolojisi üzerine araştırmalar yoğunlaşıyor olsa da, insan tümörlerinde T_{reg} hücrelerin özellikle timustan mı ilk olarak ortaya çıktığı yoksa antijen spesifik bir stimülasyon nedeniyle periferde mi oluştuğu hala belirsizdir. T_{reg} hücrelerinin, immün sistemin kendi hücrelerine karşı tepki vermemesi için var olan dengenin gerçekleşmesinde merkezi bir fonksiyonu olmasına rağmen bu negatif yöndeki düzenleyici aktivite ters etkili gerçekleşerek tümörlere ve viral enfeksiyonlara karşı normalde olması gereken immün cevabı baskılayabilir. Yani T_{reg} hücreleri kanser hastalarında anti-tümör immün cevabı bozmaktadır (8, 13, 15, 16). Yapılan çeşitli çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Akciğer, pankreas, göğüs, karaciğer, deri vb. kanserlerde periferik kanda ve tümörün iç-dış çevresinde yüksek seviyelerde $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücreleri saptanmıştır (25,26). Akciğer kanseri hastalarından alınan tümör dokusundan izole edilen T_{reg} hücrelerinde, in vitro anti- $CD3/$ anti- $CD28$ ile uyarılmış T hücrelerinin güçlü immünsupresif etkisi gösterilmiştir (27,28). Doğal olarak bulunan $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücrelerine ek olarak IL-10 üreten $Tr1$ hücrelerinin de kanser hastalarında etkisiz anti-tümör yanıtı sebep olduğu saptanmıştır. Buna örnek bir çalışma olarak, insan over tümörlerinde plazmasitoid dendritik hücrelerin IL-10 salgılayan $CD8^+ T_{reg}$ hücrelerinin anti-tümör immün cevabı IL-10 ile baskılama aktivitesini indüklediği bulunmuştur (29). Viehl CT ve arkadaşları, $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücrelerinin azaltılmasının farelerde pankreas kanserinde immün yanıtı ilerlettiğini ortaya koymuştur (30). Heier ve arkadaşları, $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ hücrelerinin azaltılmasının farelerde B hücreli lenfoma modelinde lokal tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir (31). Yokokawa ve arkadaşları, periferik kandaki $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+ T_{reg}$ hücrelerinin prostat kanseri hastalarında fonksiyonunun arttırdığını göstermişlerdir. T_{reg} hücrelerinin kanser hastalarında artan miktarlarda görülmesi yüksek mortalite ve azalan hastalıktan bağımsız sağkalım süresi ile ilişkilendirilmektedir (32).

2.2.SAFRA KESESİ

2.2.1.Anatomi ve Histoloji

Safra kesesi, sağ hepatic lobun arka yüzüne yapışmış, armut şekilli bir kesedir. Yetişkinde uzunluğu yaklaşık 10 cm, genişliği yaklaşık 3, 4 cm ölçülür. Fundus, cisim ve boyun bölgelerinden oluşur.

Safra kesesi, sağ hepatic arterin bir dalı olan sistik arter ile beslenir. Lenfatik drenajı hepatic hilum yakını ve hepatoduodenal ligamentin alt kısmındaki nodları takip eden safra kesesi boyun veya sistik kanaldaki nodlara drene olur ve sonra çölyak aksdaki nodlara uzanır.

Safra kesesi duvarı mukoza, muskuler tabaka ve seroza olarak 3 tabaka içerir. Safra kesesi gastrointestinal sistemin diğer organlarındaki muskularis mukoza ve submukoza tabakalarını içermez. Mukoza, tektük küçük apikal vokuoller ve bazale lokalize nükleuslu soluk eozinofilik sitoplazmalı kolumnar hücrelerin tek bir tabakası ile sınırlanmış, farklı boyutlardaki dallanan katlantılar oluşturmaktadır (33). Lamina propriada damarlar, sinirler ve saçılmış IgA içeren plazma hücreleri gevşek bağ dokusu ile çevrelenmişlerdir. Kas tabakası, düz kas liflerinin, gelişigüzel dağılmış yığınlarını oluşturmaktadır (33). Ganglion hücreleri safra kesesi duvarının her yerinde bulunabilirler. Muskuler tabakanın hiperplazisinin oluşturduğu Rokitansky-Aschoff ve daha derinlere uzanan Lushka sinüsleri safra kesesi duvarındaki önemli histolojik özelliklerdendir.

2.2.2.Bilier Trakt Kanseri

Bilier trakt kanserleri, safra kesesi, ekstrahepatik safra kanalı ve ampulla vaterin kanserlerini içeren seyrek fakat büyük oranda fatal kanserlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bilier trakt kanseri, kolorektal, pankreas, karaciğer, mide, veya özofagus kanserlerinden daha az sıklıkta tanı almış sindirim traktının en yaygın altıncı kanseridir ve ince barsak veya anal kanserden sadece hafifçe daha yüksek vaka sayılarına sahiptir. Safra kesesi kanseri kadınlar arasında erkeklerden daha sıklıkla oluşan birkaç kanserden biridir ve oranları Amerikan Hintlileri ve Amerikan İspanyollarında diğer gruplara göre daha sıklıkla oluşmaktadır (35,36). Safra kesesi kanseri, batı ülkelerinde yılda 3.320 ölümle seyrek görülen bir kanser olmakla

beraber , insidansı giderek artış göstermektedir. Bu sayı Japonya’da yılda 17.599 ile kanser ölümlerinin yaygın bir nedenini oluşturmaktadır . Kadınlarda 3-4/1 oranında daha sık görülür. Tanı anında olguların % 90’ ın dan fazlası 50 yaşında veya daha yaşlıdır.

2.2.3. Risk Faktörleri

Safra kesesi kanserine yol açan risk faktörleri safra taşı, ilerleyen yaş, kadın cinsiyet, anomalili pankreatobilier duktal birleşim yeri, belirli etnik gruplar ve coğrafik populasyonlar olarak belirlenmiştir (36) .

Proliferasyonu ilerleten mutasyonlar, safra taşı oluşumu, safra kesesi disfonksiyonu, kronik infeksiyon ve inflamasyon gibi faktörler safra kesesi kanserinin artmış riski ile ilişkilmesi muhtemeldir. Vakaların önemli bir kısmı çok sayıda risk faktörüne sahiptir.

Şili, Ekvator, Kolombiya, Bolivya, Güney Hindistan, Pakistan, Kore, Japonya, Slovakya, Polonya, Çek Cumhuriyeti gibi coğrafik bölgelerde safra kesesi kanser riskinin arttığı bulunmuştur. 5., 6. dekatta risk artmakla birlikte, eğer çok sayıda risk faktörü varsa ve yüksek insidanslı alanlarda gençlerde de görülebilmektedir. Kadınlar erkeklere göre daha yüksek riske sahiptir. 5’ten fazla doğum yapanlar 5’ten az doğum yapanlara göre daha yüksek riske sahip bulunmuştur. Safra kesesi kanseri aile öyküsünün 1. derecede etkili olduğu vurgulanmıştır.

Safra kesesi kanserli vakaların %60-80’inde safra taşı ile birlikte bulunmaktadır. Safra taşı büyüklüğü 3 cm’den büyük olanlar, çok sayıda taşa sahip olanlar ve 20 yıldan fazladır safra taşı olanların daha yüksek riskli olduğu belirlenmiştir. Safra kesesi poliplerinin çapları arttıkça kanser riski artmaktadır.

Obesite ve sigara içiminin yanında, diyetle düşük alınan sebze, lifli besinler, vitamin B6, C ve E içeren besinler, yüksek alınan kalorili, karbonhidratlı, kırmızı et ve kırmızı Şili biberli yiyeceklerde safra kesesi kanser riskinin yüksek olduğu bulunmuştur. Serum yüksek trigliserid ve düşük LDL oranları kanser riskini artırabilmektedir.

Yağ, kimyasal, mineral, tekstil ve kağıt endüstrisinde çalışanlar artmış riske sahiptir. Metildopa, izoniazid, oral kontraseptif ve hormon replasman tedavisi alanlarda artmış risk bulunmuştur.

2.2.4.Patolojik Görünüm

Azalan sırayla en yaygın predispozan durumlar safra kesesi taşı, pankreatobilier duktal anomaliler ve safra kesesi polipleridir. Adenom karsinom sekansı safra kesesi poliplerinde bulunabilmektedir ve olguların %1'inden fazlasında bulunabilmektedir (37). Bu gibi kanserler bir safra kesesi polibinin içinde gelişir. Bununla birlikte çoğu gastrik polip (%95'i) nonneoplastik natürdedir. Safra kesesi polipleri eğer 1 cm'den daha büyükse, heterojen ekodaysa, yükseklik/genişlik 0.8'den büyük bir orana sahipse , hızlı bir büyüme gösteriyorsa, düzensiz bir safra kesesi duvarına sahipse, artmış vaskülarite gösteriyorsa safra kesesi poliplerinin malign olması muhtemeldir.

En sık histolojik tipi adenokarsinomdur. Bütün safra kesesi tümörlerinin %98'ini oluşturur ve 2/3'ü orta ve az diferansiyedir. İnfiltratif adenokarsinomlar cakaların %65'inde görülürken, papiller tipi %15, koloidal tipi ise %10 görülmektedir. Safra kesesi karsinomlarının çoğu fundus (%60) , % 30'u gövde ve %10'u boyun kısmı yerleşimlidir. Özellikle intestinal tipte metaplazinin, safra taşı ve pankreatobilier anomalili olan vakalarda anahtar bir prekürsör lezyon olduğu bulunmuştur. Metaplazi yaşla birlikte artış gösterir ve yüksek insidans alanlarında semptomatik safra taşları için rutin kolesistektomiye giden vakaların % 70'inde var olduğu bulundu. Displaziden gelişmiş safra kesesi kanserine progresyonun süresi 15 yıl civarındadır. Displazi ve karsinoma in-situ formunda prekürsör lezyonlar safra kesesi kanserli vakaların %80'inde tümöre bitişik alanlarda bulunmuştur.

2.2.5.Moleküler Görünüm

Mutasyonların progresif toplanması belirgin malignensinin gelişimini sonuçlamaktadır. Yaygın genetik değişimler onkogenler, tümör supresör genler, mikrosatellit instabilite ve gen prometer alanları metilasyonundadır. Safra kesesi kanserli vakalarda dominant mutasyon p53 gendedir. Çoğu çalışmalarda p53 için pozitif immünreaktivite safra kesesi kanserli vakaların %50'sinden fazlasında bulunmuştur. TP53'ün exon 5'in 8'inin analizi safra kesesi kanserin %31'den %70'e nokta mutasyonları göstermiştir. Ayrıca 17p13 delesyonları (p53'ün kromozomal

lokasyonları) safra kesesi kanserin %58-%92'sinde rapor edilmiştir. Bununla birlikte delesyonların gerçek natürü farklı populasyonlar arasında farklı olabilir.

K-ras mutasyonları özellikle pankreatikobilier anomalililerin %40-50'sinde bulunmuştur (37). *p21* mutasyonları safra kesesi kanserli vakaların %28'inde görülmektedir ve özellikle *p53* ve *p27* ile birlikte olan varlıkları daha zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir (37). *p 16*'nın inaktivasyonu safra kesesi kanserli vakaların %41'inde gözlemlenmiştir ve zayıf gidişle ilişkilendirilmiştir. Siklooksijenaz 2 (*COX2*) enzim tümör büyümesini ilerletir, neovaskülarizasyon ve *COX2*'nin varlığı zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. *COX2* ekspresyonu displastik doku ve belirgin malign dokuda sırasıyla %70 ve %73'ünde bulunur. Mikrosatellit instabilite safra kesesi kanserli vakaların %10'unda bulunur ve displastik ve tümöre komşu metaplastik dokuda tanımlanmıştır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (*VEGF*) ve heparanaz ekspresyonu tümör ilerlemesi ile sürekli artar. Bunların varlığı tümör büyümesi ve metastaz için kritik olan neovaskülarizasyonu ilerletir. *p 53* mutasyonu ve *VEGF* upregulasyonu birlikte tümör vaskülaritesini ilerletir. *VEGF* safra kesesi kanserinde önemli bir hedef gibi ortaya çıkar. Mikrovasküler dansitenin bağımsız bir zayıf prognostik faktör olduğu bulunmuştur. Nitrik asid sentaz kronik kolesistitli vakaların %88'inde ve adenokarsinomların %71'inde safra kesesi dokularında ekspresse olmuştur. Frajil histidin triad genin kaybı safra kesesi kanserde hemen hemen evrenseldir ve safra kesesi kanserinin erken sekansial gelişiminde saptanmıştır.

h TERT/Telomeraz bölgesinde mutasyonlar mukoza anormalliğinin artan derecesiyle artış gösterir; normal dokuda %3, düşük dereceli displazide %25, yüksek dereceli displazide %82, adenokarsinomlarda %93 oranlarında görülür. *c -erb-B2* onkogen safra kesesi kanser tümör dokusunun %10-46'sında bulunur, fakat displazide yoktur ve zayıf prognoz için bir belirteçdir. Bu genetik değişimlerden fazlası adhezyon moleküllerinin azalmış ekspresyonu zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir. Gen promoter alanlarda hipermetilasyon zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiş olan *p 53*, *MGMT* ve *DCL1* gibi tümör supressör genlerin inaktivasyonuna neden olur.

2.2.6.Tanısal Modalitelerde Gelişmeler

Safra kesesi, histolojik perspektifte bakıldığında erişilemez bir organdır. Görüntüleme yöntemleri tanı ve stagelemede önemli bir rol oynar. Safra kesesi

kanserinde 3 yaygın radyolojik pattern; safra kesesi kitlesi (%40-65), fokal veya diffüz duvar kalınlaşması (%20-30) ve polipoidal lezyon (%15-25). Yakalanmış safra kesesi taşı ile oluşan safra kesesi fossa kitlesi sıklıkla hastalığın daha fazla gelişmiş bir formunu sergiler. Komplike olmamış kronik kolesistit duvar kalınlaşması oluşturarak en sıklıkla tanı karışıklıklarına neden olan durumdur. Polipoidal tümörler genellikle iyi diferansiye, rezektabldır ve daha iyi bir prognoza sahiptir.

Ultrasound (US) değerlendirilmesi saptanan safra kesesi patolojisi için bir köşe taşıdır. Özellikle açık safra kesesi kitlesi veya safra kesesi duvar kalınlaşması varlığının saptanmasında faydalıdır.

Komputarize tomografi (CT) erken lezyonların saptanması, bitişik yapılarda (özellikle portal ven ve hepatik arter gibi) hastalığın yayılımının bulunması ve doğru olarak stage tayininde önemli bir araçtır. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) biliyer, vasküler ve hepatik invazyonda çok faydalı olduğu bulunmuştur.

Pozitron Emisyon Tomografi (PET) florodeoksiglikozu alan tümör hücrelerini etkin bir şekilde gösteren bir modalitedir. Endoskopik retrograd kolanjiografi sırasında elde edilmiş safra K-ras, h TERT ve diğerleri gibi moleküler belirteçler kadar malign hücreler için merkezleşebilir ve analiz edilebilir. CEA, CA 19-9, CA-125 ve CA-242 gibi çeşitli safra kesesi belirteçleri çalışılmıştır. CA-242 %84'lük bir duyarlılıkla benign biliyer bozukluklardan malignansinin ayrılmasında özellikle faydalıdır. Bu belirteç CA19-9 ve CEA'den daha faydalı bulunmuştur. Bu belirteçler tümör yükünün ve terapiye yanıtın değerlendirilmesinde bir role sahip olabilir (37).

2.2.7.Stageleme

Uzun yıllardır Nevin'in modifiye sistemi kullanılmaktaydı. Japon Biliyer Cerrahi Birliği stageleme sistemi tümörleri 4 safhada klasifiye etmiştir: Stage I, safra kesesi kapsülünde sınırlanmış; Stage II N1 (1 adet lenf düğümü metastazı) ve/veya minimal karaciğer/safra kesesi invazyonu; Stage III, pozitif N2 lenf nodları ve/veya belirgin karaciğer/safra kanalı invazyonu; Stage IV, uzak metastazdır. 2010'da kanserde Amerikan birleşik komitesinin yedinci yazısı basitleştirilmiş tümör nod metastaz (TNM) klasifikasyonu yayımlanmıştır. Son zamanlarda en yaygın olarak kullanılan (tablo 2) .

Erken safra kesesi kanseri, safra kesesi duvarında sınırlı (Tis, T1, T2 lezyonları) primer tümörü yansıtır ve safra kesesi serozasına penetre olan (T3, T4 lezyonlar) gelişmiş safra kesesi kanserini yansıtır. Safra kesesi kanserinde stage I veya stage II küratif amaçla potansiyel olarak rezektabl gibi kategorize edilmiştir. Stage III genel olarak vasküler invazyon veya multipl bitişik organların tutulumunun sonucu olarak lokal olarak anrezektabl hastalığa işaret eder; stage IV uzak metastazla anrezektabilitte sergiler.

Tablo 2. Safra kesesi adenokarsinomunda TNM sınıflaması (AJCC-2010).

Primer Tümör (T)

Tx	Değerlendirilemeyen primer tümör
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
Tis	Karsinoma <i>in situ</i>
T1a	Tümör lamina propriayı invaze eder
T1b	Tümör muskuler tabakayı invaze eder
T2	Tümör perimuskuler bağ dokusunu invaze eder Seroza ötesine veya karaciğere yayılım yok
T3	Tümör serozayı perforer eder ve/veya doğrudan karaciğeri invaze eder Ve/veya 1 bitişik organ/yapı tutulur
T4	Tümör ana portal ven veya hepatik arteri invaze eder veya 2 veya daha fazla ekstrahepatik organ tutulur

Çevresel lenf nodları (N)

NO	Çevresel lenf nodu metastazı yok
N1	Kistik kanal, ana safra kanalı, hepatik arter ve / veya portal ven Boyunca nodlara metastaz
N2	Periaortik, perikaval, superior mezenterik arter ve/veya çölyak arter Lenf nodlarına metastaz

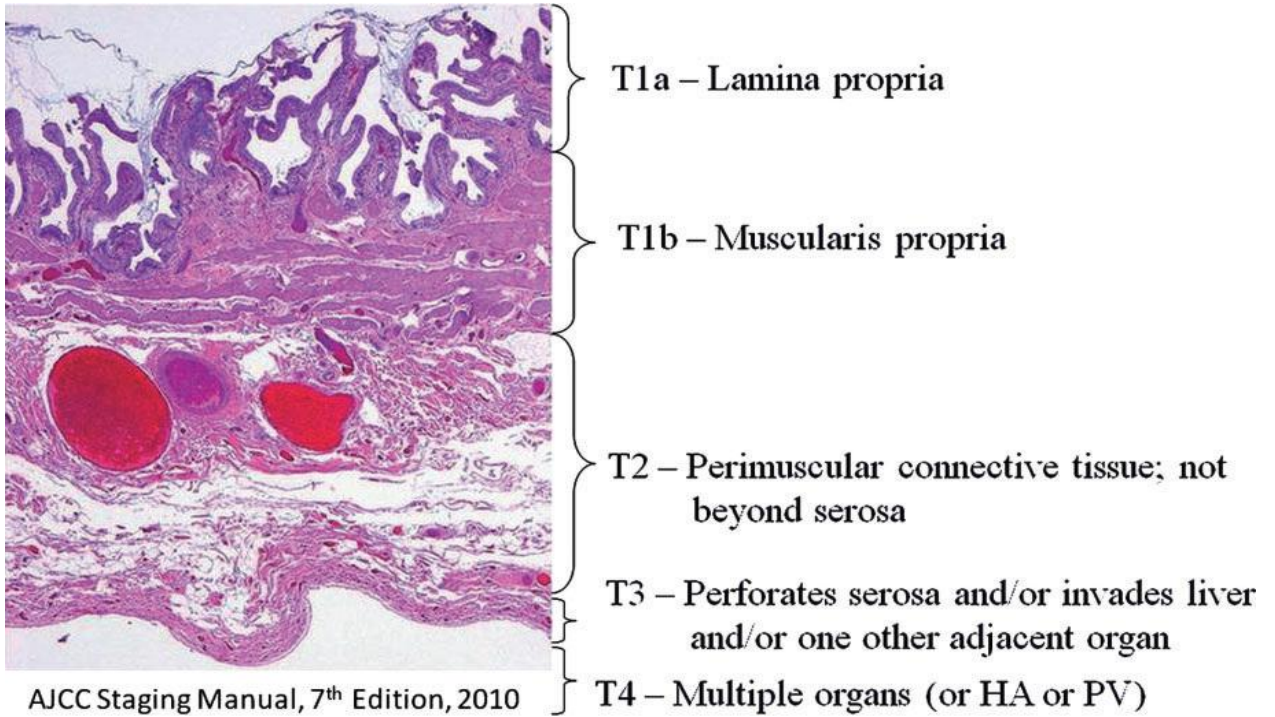
Uzak Metastaz (M)

MO	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Stage Gruplaması

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage IIIA	T3	N0	M0
Stage IIIB	T1-3	N1	M0
Stage IV A	T4	N0-1	M0
Stage IV B	herhangi bir T	N2	M0
	Herhangi bir T	herhangibir N	M0

Figür 1. Tümör evrelendirilmesinin histolojik görünümü



2.2.8.Cerrahi tedavi

Cerrahi rezeksiyon safra kesesi kanseri için tedavinin dayanak noktasıdır. Hastalığın stage'ine bağlı yaklaşım, lokal bilginin elde edilebilirliği, olgunun tümör yayılım durumu ve preoperatif tanının olup olmadığından şüphelenilmiş veya şüphelenilmemiş olmasıdır. Bu bulguların varlığı safra kesesinin küratif rezeksiyonunun yapılabileceğinin değerlendirilmesinde etkili olur. Uygun vaka seçimi, gereksiz ve etkisiz cerrahi eksplorasyonlardan korunması üzerine kurgulanmış olmamalıdır. Optimal bir cerrahi yaklaşım cerrahi riskinin mutabakatı ve vakanın kısa ve uzun dönem gidişi önemsenmiş olmalıdır. Vakalar uygun bilgi lokal olarak elde edilemediğinde, bu durumla büyük bir merkezi deneyimi yansıtmış olmalıdır. Cerrahinin riski ile vakaların (kısa ve uzun dönem) gidişini dengeleyen optimal bir cerrahi yaklaşım önemsenmiş olmalıdır. Vakalar için lokal olarak uygun bilgi elde edilemediğinde, bu durumda büyük bir merkezi deneyim yansıtılmış olmalıdır.

Histolojik T evresi gerekli rezeksiyon genişliğinin tek en önemli belirteçidir. Bu lenf nodu tutulumu ve uzak metastazın yayılımı ile direkt olarak ilişkilidir. T1a lezyonlar için sadece basit kolesistektomi yeterlidir; Kür oranı % 85-100 oranına sahiptir. Bu gibi lezyonlar genellikle kolesistektomi sonrasında keşfedilmiştir, daha fazla müdahale gerektirmez. Bununla birlikte bir patolog tarafından dikkatli bir şekilde yapılan tekrar değerlendirme ile tespit edilen maksimum invazyon derinliği hastalığın stage (evresinin) doğru olarak saptanması için önemlidir, böylece tam bir kür fırsatı sağlar. T1b lezyonlar için, radikal kolesistektomi, basit kolesistektomi sonrası 1 yıllık yaşam şansının sadece %50 olması sebebiyle gerekli görülmüştür. Radikal kolesistektomi ile safra kesesinin kaldırılmasından ayrı safra kesesi yatağının kama rezeksiyonu (IV ve V. Segmetleri içeren) ve portal lenfadenektomi yapılmaktadır.

T2 lezyonlar için daha geniş cerrahi rezeksiyon daha geniş karaciğer rezeksiyonu ve hepatoduodenal lenfadenektomi ile standard radikal kolesistektomiye içerir.

T3 lezyonlar çevreleyen organların en-blok rezeksiyonu için gereken bir tabloda, safra kanalı rezeksiyonu, yaygın lenf nodu disseksiyonu ve cerrahi rekonstrüksiyon gibi cerrahiler için ilginç problemler oluşur. Safra kanalı rezeksiyonu için kesin endikasyon sistik kanalın sınırının malign hücreler için pozitif veya sağ hemihepatektominin genişliğinin yeterliliğinin olup olmadığıdır. Bazı Japon cerrahlar

kolaylaştırılmış lenf nod disseksiyonuna safra kanalının kaldırılmasının eklenmesini tercih eder. Komplet rezeksiyon ile radikal cerrahi sonrası 5 yıllık sağkalım % 30-50 dir. T4 lezyonlar küratif amaçla rezektabl olması muhtemel değildir. Vakalar daha sonra palyatif tedaviye gitmelidirler.

2.2.9. Adjuvan Kemoterapi

Safra kesesi kanserinin tanı anında yakın ve rejyonel alanlara yayılması muhtemeldir. İleri safra kesesi kanserli bütün hastalarda adjuvan kemoterapi alınması bu nedenle gereklidir. Adjuvan kemoterapi özellikle R0 rezeksiyon başılamayan kişilerde gereklidir. Bununla birlikte veri birkaç faz II deneme ile sınırlanmıştır. Bu çalışmalarda, kolanjiokarsinomla safra kesesi karsinomları aynı gruba alınmıştır ve ayırmaları zordur. Bu çalışmalarda gemitabin, floroprimidin ve platin deriveleri gibi üç sınıf sitotoksik ajan kullanılmıştır. Tek bir ajan olarak kullanıldığında fluorourasil %20'lik bir yanıt oranı sağlamıştır. Sadece gemitabin kullanıldığında yanıt oranı % 36 olmuştur.

Son bir dönüm noktası çalışma, Safra kesesi kanserinden standard tedbirin gemitabin ve sisplatin kombinasyonu olduğu vurgulanmıştır. Sisplatin-gemitabin grubundaki hastalarda ortalama genel yaşam oranı 11.7 ay olmuş, 206 kişilik sadece gemitabin grubunda yaşam oranı 8.1 ay olmuştur ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.001$). Olumsuz yan etkiler sisplatin-gemitabin grubunda nötropeninin daha yüksek istisnası ile benzerdir.

Yeni faz II denemeler gemitabin, kapesitabin , sisplatin ve irinotekan değişen kombinasyonlarıyla birleştirilmiştir. Sonuçlar değişkendir. Bununla birlikte komplet rezeksiyona giden hastalar ek fayda görmemiştir. Genel hayatta kalma minimaldir ve bu ajanlara yanıt kişisel varyasyonlar gösterebilir (38).

2.2.10.Radyoterapi

Safra kesesi kanserinde adjuvan radyoterapinin rolünü araştıran veri kalitesinde yetersizlik vardır. Mojca ve arkadaşlarının datası adjuvan radyoterapi verilsin veya verilmesin ortalama hayatta kalımın 14 ay olduğunu göstermiştir. Radyoterapisiz sağ kalım 8 aydır. Sağ kalım faydalanması rejyonel yayılım ve hepatik infiltrasyon arasında araştırılmıştır ve anlamlı bulunmuştur.

2.2.11.Moleküler Hedeflenmiş Tedavi

Tümör hücre proliferasyonu ve büyümesinde intraselüler durumların anlaşılması hedef anahtar moleküler alanları olan terapötik ajanların gelişmesi için bir yol sağlamıştır. Epidermal büyüme faktör reseptörleri , anti anjiyojenik ajanlar ve MEK inhibitörleri hedefleyen ilaçlar ilerlemede özellikle önemli olmuştur. Çok hedefli bir yaklaşım sinerjestik bir antitümör etkilere sahiptir ve monoterapiler kadar iyi tolere edildiği ve daha atkili olduğu bulundu. Kemoterapi ile kombine edildiğinde moleküler hedefli tedavinin sadece kemoterapi tedavisinden daha fazla fayda verdiği gösterilmiştir (39).

2.2.12.Prognoz

Prognoz vaka safra kesesi kanserinin semptomlarına bağlı görülmüşse sönüktür. Ağrı, sarılık, anoreksi, ağırlık kaybı veya safra kesesi kitlesi gelişmiş hastalığın özellikleridir. Tersine safra taşı için rutin kolesistektomi anında safra kesesi kanserinin tesadüfen saptanması durumunda prognoz iyidir. Tümör çapı, invazyon derinliği ve lenf nodu tutulumu zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (40). Tümör çapı ve derinliği diğer prognostik faktörlerle yüksek derecede bir korelasyon gösterir (41). İnvazyonun destrüktif paterni, infiltratif patern ile karşılaştırıldığında daha zayıf bir gidişe sahiptir. Histolojide, az diferansiye malignensi, perinöral ve perivasküler invazyon varlığı , GLUT-1 ekspresyonu, p53, p16 ve p27 gende mutasyonlar zayıf hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir. Papiller karsinomlar daha iyi bir prognozla ilişkilendirilmiştir.

2.3.PANKREAS

2.3.1.Pankreas anatomi ve fizyolojisi

Pankreas, karın boşluğunda mide ile duodenum arasında yerleşik, 12-20 cm uzunluğunda, 3-4 cm genişliğinde ve 70-120 gram ağırlığında bir organ olup;vücuttaki iki ana fizyolojik işlemi düzenler (42,43). Pankreas ekzokrin ve endokrin salgı işlevlerini gerçekleştirerek hem sindirim hem de glukoz metabolizmasında rol alır (44). Yapısal olarak incelendiğinde pankreasın büyük bölümünün dış salgı işlevini gerçekleştiren hücreler tarafından oluşturulduğu görülür, iç salgı işlevi gören hücreler ekzokrin doku içerisine dağılmış olarak bulunurlar.

Pankreasın ekzokrin işlevini gören kısmı; asinar ve kanal (duct) hücrelerinden oluşur (41,42). Asinar hücreler, sindirim enzimlerini üretmekte olan hücreler olup dallanmış 9 kanal sisteminin uçlarında üzüm salkımı şeklinde kümeleşmişlerdir ve pankreatik dokunun büyük bir bölümünü teşkil etmektedirler . Asinüsler içine biriken salgı lobcuklar içi kanalcıklar aracılığı ile lobcuklar arası kanallara boşaltılır . Lobcuklar ve asinüsler arasında bağ dokusu bulunmaktadır .

Pankreasın iç salgı bölümü Langerhans adacıkları denilen özel hücre ve damar kümeleri tarafından oluşturulmuştur (45). İnsan pankreasında bir milyondan fazla Langerhans adacığı bulunmaktadır . Langerhans adacıkları pankreasın dış salgı yapısının içinde adacıklar oluşturacak bir biçimde dağılmışlardır . Langerhans adacıklarında α , β ve δ olmak üzere üç ana tipte endokrin hücre bulunmaktadır . β - hücreleri Langerhans adacıklarındaki hücrelerin %80'ini oluşturur ve insülin hormonunu salgırlar. α -hücreleri glukagon salgırlarken, δ -hücreleri de somatostatin salgılamaktadır.

2.3.2.Pankreas organ gelişimi

Morfolojik ve işlevsel farklarına rağmen pankreasın hem endokrin hem de ekzokrin hücreleri aynı embriyonik kökenden gelmektedirler (46). Gastrulasyon sırasında endoderm tabakasından gelişen çok katlı epitel hücrelerinin hemen hepsi hem endokrin hem de ekzokrin hücre potansiyeline sahiptirler . Farklılaşma sırasında, uyarı sağlayan birçok molekül görev alır ve uyarı ağının her bir elemanı hücre tipine ve farklılaşma zamanına bağlı olarak işlev kazanır . Pankreas gelişiminde genetik program, transkripsiyon faktörlerinin ve çevre dokulardan gelen

sinyallerin belli bir hiyerarşiye göre işlenmesiyle gelişmektedir . Endoderm tabakasından pankreasa dönüşecek bölge sonic hedgehog (SHH) uyarısının olmamasıyla belirlenir . Pdx1 (Pancreatik and duodenal homeobox gene 1) transkripsiyon faktörü pankreatik hücrelere kaynaklık eden erken pankreatik projenitör hücrelerin çoğalması ve dallanması için gereklidir . Pdx1 anne karın evresi (fetal) gelişimi sırasında da beta hücre hatlarında fazlaca ifade edilmekte olup, beta hücrelerinin farklılaşmasında ana rol oynar . Pdx1 erişkin pankreasında da beta hücrelerinin işlevleri için zorunludur, insülin, glukokinaz ve GLUT2 gibi glukoz homeostasisinde rol alan genlerin transkripsiyonunda rol alır.

2.3.3.Pankreatik Kanser

Pankreasın infiltratif duktal karsinomu daha yaygın olarak pankreatik kanser olarak bilinir. Akciğer, kolon ve meme kanserinin arkasından kanser ölümlerine yol açan 4. nedendir (47). Pankreatik kanser en yüksek mortalite oranına sahip kanserlerden biridir. 2008’de Amerika’da pankreatik kanser tanısı almış 37000 kişi olduğu saptanmıştır. Ve bunların hemen hemen hepsinin hastalıklarından öleceği tahmin edilmiştir. 5 yıllık hayatta kalma oranı % 5’den daha az ve prognoz kötüdür.

Pankreasda, nonneoplastik epitelden histolojik olarak iyi tanımlanmış noninvaziv lezyonlara, küçük duktuslar ve duktulilerde invaziv karsinoma bir progresyon vardır. Bu prekürsör lezyonlar “pankreatik intraepitelyal neoplaziler” (Pan INs) olarak isimlendirilirler . PanINs’lerde tanımlanmış genetik ve epigenetik değişimler invaziv kanserde bulunanlara benzerdir. PanIN’lerde epitelyal hücreler yüksek oranda kısalmış telomer yapıları gösterir. PanIN’lerde telomer uzunluğunun kritik bir kısalması progresif kromozomal anormalliklerin toplanması ile bu lezyonlar invaziv karsinom gelişimini predispoze edebilir (48).

2.3.4.Moleküler Karsinogenez

Pankreatik kanserde sıklıkla multipl genler değişmiştir ve genetik değişimlerin patternleri diğer malignansilerde görülenlerinkinden farklıdır (49). KRAS gen (kromozom 12p) pankreatik kanserde en sıklıkla değişmiş onkogendir. Bu onkogen vakaların % 80-90’ında nokta mutasyonuyla aktive olmuştur. Bu nokta mutasyonlar bir proteine dönüşen K-ras proteininin intrinsik guanozin trifosfat aktivitesini bozar. K-ras döngüdeki Ras, Fos ve Jun transkripsiyon faktörün aktivasyonunu ortaya çıkarır

ve ek olarak da birkaç intrasellüler sinyal iletim yolağını aktive eder. CDKN2A (p16) p16/CDKN2A gen (kromozom 9P) pankreatik kanserde % 95 ile en sıklıkla inaktive olmuş tümör süpresör gendir (50). P16 protein hücre siklusu kontrolünde kritik bir rol oynar ve p16'nın inaktivasyonu önemli bir hücre siklus kontrol noktasını bloke eder. SMAD4 tümör süpresör gen (kromozom 18q) pankreatik kanserlerin %55'inde inaktive olmuştur (51). SMAD4 hücre yüzey reseptörlerin TGF β ailesinden sinyal dönüşümünde önemli bir rol oynayan bir protein kodlar. SMAD4 diğer kanser tiplerinde seyrekçe inaktive olmuştur. p53 tümör süpresör genin inaktivasyonu (kromozom 17p) pankreatik kanserin %50-70'inde görülür (52). P 53 protein hem hücre siklus kontrol noktası, hem de bir hücre ölümü (apoptoz) nedeni gibi her iki şekilde etki gösteren ve hücre duyarlılığına neden olan bir nükleer DNA bağlayıcı proteindir.

2.3.5.Diğer Genler

Daha az yaygın bir kısmıdır, ancak bununla birlikte önemlidir. Genetik lokusun pankreatik kanserde hasarlanmış olduğu görülmüştür. Örneğin, AKT2 gen (kromozom 19q) % 10-20'sinde ampfiye olmuştur, MYB gen (6q) % 10'unda, GATA 6 gen (kromozom 18q) % 10'unda ve NCOA3/A1B1 gen (kromozom 20q) %10'unda ampfiye olmuştur. BRCA2 (kromozom 13q), LKB1/STK11 (kromozom 19p), MAP2K4/MKK4 (kromozom 13q) ve RB1 (kromozom 13q) tümör süpresör genler pankreatik kanserin %10'undan daha azında inaktive olmuştur.

2.3.6.Metilasyon Anormallikleri

Birkaç metilasyon anormalliği pankreatik kanserde de oluşur. Birkaç tümör süpresör genin promotorunun hipermetilasyonu genlerin transkripsiyonel sessizliği ile ilişkilendirilmiştir.

2.3.7.Gen Ekspresyonu

DNA değişikliklerine ek olarak da gen ekspresyonunun global analizleri pankreatik kanserde yüksek oranda ekspresse olan birkaç gen bulunmuştur. Bu genler yeni terapötikler için potansiyel hedeflerdir ve gelecekte tarama testlerinin temelini oluşturabilir. Örneğin Hedhegog sinyal yolağının pankreatik kanserde aktive olduğu görülmüştür ve siklofosamid ile bu yolağın inhibisyonu deneysel sistemlerde pankreatik kanserin büyümesini bloke eder (53).

2.3.8.Epidemiyoloji, Etyoloji ve Patogenez

Pankreatik kanser % 80'i 60-80 yaşları arasında oluşan yaşlıların primer bir hastalığıdır (54). Siyahlarda beyazlarınkinden daha yaygındır.

Güçlü çevresel etkilerden biri, pankreatik kanserde 2 kat daha yüksek riske sahip olduğuna inanılan sigara içimidir. Bu artmış riskin büyüklüğü her ne kadar çok yüksek değilse de sigara kullanan kişilerin büyük bir kısmının diyetle yüksek oranda yağ tüketenlerin olması nedeniyle önemlidir, fakat daha az etkilidir kalma oranı r. Kronik pankreatit ve diabetes mellitus herikisi de pankreatik kanserin artmış riskiyle ilişkilendirilmiştir. Pankreatik kanser kronik pankreatitli olgularda daha büyük sıklıkla artar (55), fakat herediter pankreatitin istisnai olarak pankreatit için nedensel bir rol oynadığı durum iyi vurgulanmamıştır. Kronik pankreatitli bireylerde sigara ve alkol kullanımı ilişkisinin bir miktar temelini oluşturabilir (56). Bir hasta bireyde kronik pankreatitin, pankreatik kanserin bir nedeni veya hastalığın bir etkisi olup olmadığının anlaşılması küçük bir pankreatik kanal tıkanıklığı ve kronik pankreatit oluşumunun ortaya çıkmasına kadar zor olabilir. Pankreatik kanserle diabetes mellitusun ilişkisi benzer bir tartışma diabet pankreatik kanserin bir sonucu gibi ortaya çıkarak gelişebilmesinde uygulanır. Yeni hamle yaşlı bir hastada pankreatik kanserli olgunun ilk belirtisi olabilir (55).

Pankreatik kanserin familial kümelenmesi rapor edilmiştir ve kalıtsal genetik faktörlerin artan sayısı artmış pankreatik kanser riskini tanımlamıştır (Tablo). BRCA2 mutasyonları pankreatik kanserli Askenazi yerlilerinde yaklaşık % 10 oranında hesaplanır. Bu mutasyonlara sahip olgular meme veya ovarian kanserin bir aile öyküsüne sahip değildir. CDKN2A (p16)'da mutasyonlar melanoma eğilimli ailelerin bireylerinde hemen hemen her zaman ortaya çıkar (57).

Ekstrasellüler matriks protein pallerini kodlayan PALLD gende bir mutasyon pankreatik kanser oranı yüksek bir ailede rapor edilmiştir. Mutasyon diğer ailelerde bulunmadı, fakat pallerin pankreatik kanseri çevreleyen stromada yüksek oranda ekspresyon olmuştur.

2.3.9.Morfoloji

Pankreas kanserlerinin yaklaşık % 60'ı bezin baş kısmından, %15'i gövdeden, % 5'i kuyruk kısmından çıkmaktadır; % 20'si ise diffüz olarak tüm bezi tutmaktadır.

Pankreas karsinomları genellikle sert, uzantılar oluşturan, gri-beyaz, zayıf belirmiş kitlelerdir.

Karsinomların büyük bir kısmı glandlar oluşturan ve müsin sekrete eden bazı derecelerde normal duktal epitelyum özelliği gösteren duktal adenokarsinomlardır. Pankreatik kanserin iki karakteristik özelliği: yüksek oranda invaziv olması (peripankreatik dokularda yaygın olarak invaze “erken” invaziv kanserde bile) ve fibroblastlar, lenfositler ve ekstrasellüler matriksin (desmoplastik reaksiyon) yoğun non-neoplastik konakçı reaksiyonunu içermiş olmasıdır.

Pankreas başının çoğu karsinomları pankreas başına doğru uzanan ana safra kanalını obstrükte eder. Bunun sonucunda pankreas başı karsinomlu vakaların %50'sinde bilier ağacın belirgin distansiyonu mevcuttur. Bu duruma zıt olarak, pankreasın gövde ve kuyruğunun karsinomları bir süre için bilier traktta invazyon oluşturmaz ve sessiz kalır. Bütünüyle büyük bir kitle halinde olabilirler ve çoğu keşfedildikleri zamanda genişçe yayılmışlardır. Pankreatik kanserler sıklıkla sinirler boyunca yayılır ve retroperitonu invaze eder. Dalak, adrenaller, vertebral sütun, transvers kolon ve mideyi direkt olarak invaze eder. Peripankreatik, gastrik mezenterik, omental ve portahepatik lenf nodları sıklıkla invaze olmuştur. Uzak metastazlar ilk olarak karaciğer, akciğer ve kemiklere olmaktadır.

Mikroskopik olarak, pankreas başı karsinomları ve pankreasın gövde ve kuyruk karsinomları arasında farklılık yoktur. Düzensiz tubuler yapılar ve hücre kümeleri oluşturan orta ve az diferansiye adenokarsinom görünümündedir ve agresif, derin infiltratif büyüme patterni gösterir. Yoğun stromal fibrozis invaziv kansere eşlik eder ve organ içinde ve yakınında perinöral invazyon eğilimi gösterir. Lenfatik ve büyük damar invazyonu sıkça görülür. Malign glandlar zayıfça oluşmuştur ve genellikle pleomorfik kolumnar ve küboidal epitelyal hücreler ile sınırlanmıştır. İyi diferansiye adenokarsinomlar istisnai olark bu özellikleri göstermeyebilir.

Pankreatik karsinomların daha az yaygın varyantları adenoskuamöz karsinom, kolloid karsinom, hepatoid karsinom, meduller karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom, osteoklast tipi dev hücreli andiferansiye karsinomu içerir. Ayrıca pankreasın asiner hücreli karsinom ve pankreatoblastom olarak biline iki seyrek görülen formu vardır.

2.3.10.Pankreatik Kanserde Prognostik faktörler

Pankreatik kanserin çoğu serilerinde, 5 yıllık hayatta kalma oranı, tanının ilk 1 yılı içinde vakaların % 90'ından fazlasının ölmesiyle ve tedavi edilmemiş vakalar için 3 aylık ortalama bir hayatta kalma oranı ile %4 veya daha azına sahiptir (58).Cerrahi anında tümör pankreasa sınırlı kalmış bile olsa 5 yıllık hayatta kalma % 15'i geçmemektedir.

Prognoz ile ilişkili faktörler:

- **Tümör stage'i ve grade:** Çoğu diğer organlardaki gibi, stage en önemli prognostik belirleyicidir (59). Pankreatik duktal adenokarsinom vakaları American Joint Committee on cancer (AJCC) stageleme sisteminin her bir aşamasında yüksek oranda değişken hayatta kalma göstermektedir. Çoklu varyant analizinde tümör grade'inin hayatta kalmanın güçlü bir belirteci olduğu bulunmuştur. Mikroskopik grade açısından bakıldığında, daha iyi diferansiye tümörler daha uzun bir ortalama hayatta kalma zamanı ile ilişkilendirilmiştir (60).
- **Tümör çapı:** Küçük tümörler (4.5 cm'den daha az çaplı olanlar) küratif operasyonun ve daha uzun hayatta kalmanın daha büyük şansına sahiptir. Bununla birlikte unrezektabl tümörler için tümör çapı hayatta kalmayı etkilemez (61).
- **Kan damarı invazyonu ve rezeksiyonun retroperitoneal sınırı:** Her iki parametre de kısalmış bir hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir (62). 51 vakalık bir seride, tümör çapı, histolojik tip, grade ile ilgili hayatta kalma oranları üzerine çalışma yapılmıştır. Bu olgulardan 7'sinde retroperitoneal rezeksiyon sınırı tutulmuştur. Bu olgulara ait hayatta kalma oranları ortalama 10.6 ay bulunmuş olup, küratif rezeksiyonlu vakaların hayatta kalma oranları 22.7 ay olmuştur. Küratif rezeksiyon olmayan tümörle invaze damarlara sahip vakalarda hayatta kalma 8.8 ayken, damar invazyonsuz rezeke edilmiş vakalar için hayatta kalma 24.3 aydır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (63).

- **Lenf nodu metastazı:** Bu faktör stageleme sisteminde büyük bir öneme sahiptir. Yukarıda anlatılan çalışmada, nodal durum temelinde N0 vakalar için hayatta kalma 33 ay, N1a için 21.4 ay, N1b için 14 ay bulunmuştur. Ancak bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (63). Saptama, genellikle mikroskopik temelde yapılır, fakat moleküler tekniklerle çalışılan k-ras mutasyonunun saptanmasının lenf nodu değerlendirilmesinin yerini alabileceği iddia edilmektedir.
- **DNA ploidy:** Bu parametrenin bağımsız prognostik değeri çok sınırlıdır.
- **TGF-β1 ekspresyonu:** Bu belirleyicinin ekspresyonu daha iyi diferansiye tümörlerle ilişkilidir ve sonrasında daha iyi bir gidiş görülür, fakat bağımsız bir prognostik değeri yoktur (63).

Tablo 3: Ekzokrin pankreas tümörlerinin TNM sınıflaması (AJCC, 7.BASKI, 2010)

	Primer Tümör (T)
Tx	Primer tümör değerlendirilememiş
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in-situ
T1	Tümör pankreasa sınırlanmış, en büyük çapı 2 cm veya daha küçük
T2	Tümör pankreasa sınırlanmış ve çapı 2 cm'den büyük
T3	Tümörün duodenum, safra kanalları, peripankreatik dokulara direkt yayılımı
T4	Tümörün mide, dalak, kolon, bitişik büyük damarlardan herhangi birine direkt yayılımı
	Bölgesel Lenf Nodları (N)
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememiş
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	N1a: Tek bir bölgesel lenf nodunda metastaz var
	N1b: Çok sayıda bölgesel lenf nodunda metastaz var
	Uzak Metastaz
MX	Uzak metastaz değerlendirilememiş
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Stage Gruplaması

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0

Stage IB	T2	N0	M0	
Stage IIA	T3	N0	M0	
Stage IIB	T1	N1	M0	
	T2	N1	M0	
	T3	N1	M0	
Stage III	T4	N1	M0	
Stage IV	(*) T	(*) N	M1	(*) Herhangi bir

2.3.11.Pankreatik Kanserde Prognozu etkileyen faktörler ve tedavi Yaklaşımları

Pankreatik karsinom batı dünyasında kanser ilişkili ölüm nedenleri arasında 4. olarak sıralanan en öldürücü insan malignansilerinden biridir. 5 hastalık gruptan birinden daha azı başlangıç tanısı anında rezektabl hastalığa sahiptir. % 90'nına yakını ekzokrin duktal sistemden çıkan pankreatik duktal adenokarsinomlardır. Baş bölgesinin adenokarsinomu için insidans oranı 100000'de 5.6 olarak kalmıştır, oysa baş/gövde oranı 1973 ile 2002 arasında %46 ile (1.6/100000) artmıştır (64). Altında yatan biyolojisinin anlaşılması ve görüntüleme modalitelerinde gelişmelere rağmen pankreatik duktal adenokarsinom zayıf bir prognoza sahiptir. Bütün stage'ler birleştirildiğinde, 1 yıllık hayatta kalma oranı % 19'dur ve 5 yıllık hayatta kalma oranı % 0.4'den %4'e sıralanır (65). Gövde/kuyruk kanserleriyle karşılaştırıldığında pankreas başı kanserli olgular arasında daha yüksek hayatta kalma oranları gözlenmiştir (66).

Her ne kadar 5 yıllık hayatta kalma oranları büyük denemelerde zayıf olarak belirlenmiş olsa da, erken safha hastalık için tedavi seçimi cerrahi rezeksiyondur. Lokalize nod negatif hastalık için bile 5 yıllık hayatta kalma oranı % 10 olarak kalmıştır (66). Komplet rezeksiyona gitmiş olsa bile progresyondan bağımsız period 8-12 aylar arasında değişir ve çoğu rekürrensler 2 yıl içinde oluşur. Ne yazık ki, laparotomi sırasında küçük karaciğer metastazı ve peritoneal implantlar pankreas başı tümörlerinin %10'unda, gövde/kuyruk tümörlerinin %40'ının üzerinde bulunur.

Prognoz başlıca sistemik bir yetmezlik ile tanımlanmışken, postrezeksiyon tedavi stratejileri loco-rejyonel rekürrens kadar mikrometastatik hastalığın kontrolünü amaçlar. Geçmişte, bu durum genellikle nodal durum ile saptanırdı (lenf nodu oranı:

tutulmuş/ çalışılmış), ve bu durumun hayatta kalmanın potent bir prognostik faktörü olduğu görülür (66). Daha fazlası R0 bir rezeksiyonun tanımlanması yükselerek gelişmiştir.

Ne yazık ki, hastalık doğası gereği son zamanların tedavilerine dirençlidir. Tedavide sistemik kemoterapi, radyasyon terapi veya her iki modalitenin kombinasyonu adjuvan terapi olarak cerrahi rezeksiyonu takiben kullanılmaktadır. Rezeksiyon öncesi neoadjuvan yaklaşım kür ve komplet rezeksiyon şansını iyileştirici bir yaklaşım olarak sıklıkla kullanılmıştır. Adjuvan terapinin faydası her ne kadar görünür hale geldiyse de ,optimal tedavi modalitelerinin (kemoterapi ile birlikte radyoterapinin olup olmayacağıının) seçimi hala çelişkilidir (). Pankreatik kesit geçişi cerrahi sınırının modası geçmiş, bunun yerini retroperitoneal sınır almıştır ve bunun pozitif olduğu durumda prognozun zayıf olduğu gözlenmiştir (68).

Rekürrenslerin yaklaşık %75'i vakaların % 50-80'inde eş zamanlı uzak bozukluklar olarak tümör yatağında veya abdominal kavitede loco-rejyonel olarak lokal olarak oluşur. Rekürrens alanları karaciğer (%34-87), periton (%19-53) ve akciğer (%8-29) dır (69).

Son zamanlarda tedavi edilmiş hastaların sayısı ve cerrahisindeki beceriler ve deneyimin tanımlanması gidiş ve bağımsız prognostik faktörlerin oluşumunu etkiler , her ne kadar pankreotektomi spesmenleri için patolojik değerlendirmenin uluslar arası standardizasyonunun olmaması hastaların güvenilir olarak subgruplandırılmasının yapılmasını gerektirmiştir (70, 71) Yüksek olgulu merkezlerde cerrahi spesmenlerin histopatolojik olarak daha detaylı değerlendirilmesi pozitif rezeksiyon sınırlı vakaları daha iyi belirleyebilir (72).

HENT1 ekspresyonu adjuvan terapi aşamasında gemsitabinli kemoterapiye yanıtın faydalı bir tahmine yönelik faktör olduğu görülür. HENT1 ekspresyonlu olgular gemsitabinden faydalanırlar, HENT1'in düşük veya olmadığı olgularda ise gemsitabin tedavisinden kaçınılmalıdır. HENT1'i intrasellüler yapıların bir taşıyıcısıdır (73,74,75).

Osteonektin olarak bilinen SPARC bir ekstrasellüler matriks proteindir. Preklinik modellerde invazyon ve metastaz kadar pankreatik kanserli vakalarda zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiş olduğu ekstrasellüler bir proteindir. Son çalışmalar SPARC'ın pankreatik kanserde kollajen döngüsünde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir.

SPARC albumine bağı nabPaclitakselin bir hedefidir. Gemsitabin ile bir kombinasyonda pankreatik duktal adenokarsinomlu vakalarda bu ajanın faz I-II çalışmalarda ilerlemiş hastalıklı olgularda 12.8 aylık ortalama bir hayatta kalma ile ümit verici sonuçlar göstermiştir (76,77)

Pankreatik kanserli vakalarda CTC'nin (Sirkülasyonda bulunan tümör hücreleri) saptanmasının negatif bir prognostik değere sahip olduğu görülür. Rezektabl pankreatik kanserde de kemoterapiye ayrıca mikrometastazik hastalığa bağı lokal tedaviye ihtiyacı olan vakalarda saptanabilmesi nedeniyle önemli olduğu görülmüştür. Başka bir çalışma CTC'nin varlığının sadece zayıf prognostik bir faktör olmadığını göstermiştir (78).

Tümör hücreleri etrafında CD4 + VE CD 8 + T hücrelerin infiltrasyonunun pankreatik kanserin gidişine etki ettiği görülür. Peritümöral T hücrelerin ve pankreatik kanserle pozitif bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, pankreatik karsinomda CD8+ tümör infiltre edici lenfositler (TIL) ile birlikte CD4+ TIL'lerin varlığının cerrahi tedavi sonrası olguların gidişinin iyi bir göstergesi işlevini gördüğü belirlenmiştir. Peritümöral T hücrelerin pankreatik kanserde hayatta kalma için bağımsız bir prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır ($p<0.001$), (79, 80). Regülatör T hücrelerin yüksek prevalansının hayatta kalma için bağımsız negatif bir belirleyici yani zayıf prognozun bir belirleyici faktörü olduğu görülmüştür ($p\leq 0.001$). Bu çalışmada regülatör T hücrelerin premalign safhadan pankreatik duktal karsinoma kadar belirlenmiş kansere karşı immün yanıtın kontrolünde bir rol oynadığı bulunmuştur (81). Turcotte ve arkadaşlarının bir çalışmasında immün skorlamanın faydalı bir araç olduğu bulunmuştur. Tümöre immün yanıtın malignensinin daha iyi gidişini kontrol ettiğini göstermiştir.

2.4. KARACİĞER

Normal yetişkin karaciğer ağırlığı 1400-1600 gramdır ve tüm vücut ağırlığının %2,5' unu oluşturur. Karaciğer 2'li kan desteğine sahiptir; Portal ven hepatik kan akımının % 60-70'ini sağlar ve % 30-40'ını hepatik arter destekler. Portal ven ve hepatik arter karaciğerin alt kısmında transvers uzanan bir yarık olan porta hepatis olarak isimlenen kısımdan hilus bölgesine doğru girerler. Karaciğer içinde, portal venler, hepatik arterler ve safra kanalları portal traktta paralel ilerler.

Hepatik mikroarşitektürün terminolojisi iki farklı konseptte temellenmiştir: hepatik lobül ve hepatik asinus. Lobuler modele uygun olarak, karaciğer, lobülün periferi üzerine portal trakt ile hepatik venlerin (terminal hepatik venler) terminal bağlantıları etrafında oryante olmuş, 1-2 mm çaplı hekzagonal lobüllere bölünmüştür. Terminal hepatik venin yakınındaki hepatositler "sentrilobular", portal vene yakın olanlar ise "periportal" olarak adlandırılırlar. Asiner modelde terminal hepatik venlere yakın hepatositler portal trakttan dışarıya uzanan portal venden septal venüllere penetre olması ile oluşan kabaca üçgen şeklinde distal tepelerdir. Parankim asinüste vasküler desteğe en kapalı zon 1, terminal hepatik lobüle bitişik ve arteriyel kan desteğinden en uzak zon 3 ve intermediate alan zon 2 olarak zonlara ayrılmaktadır.

Hepatositler portal trakttan terminal hepatik venlere uzanan kribriform, anastomozlaşan tabakalar ve alanlar içinde organize olmuştur. Hepatosit alanları arasında vasküler sinüzoidler vardır. Hepatositler her iki tarafından arteriyel ve venöz vasküler yapılarla sarılmıştır ve venöz yapılar üzerinde çok sayıda küçük orifisler vardır. Hepatositler vücutta perfüzyonu en iyi olan hücrelerdir. Sinüzoidler, fenestre ve devamlılık göstermeyen endotelial hücreler ile sınırlanmıştır. Endotel hücreleri tabanı hepatositlerin bol mikrovilluslerin içine uzanan disse yapısına uzanır. Mononükleer fagosit sistemin saçılmış Kupffer hücreleri endotel hücrelerin lümenal yüzeyine yapışmıştır ve yağ içeren hepatik stellat hücreler Disse aralığında bulunmaktadır.

2.4.1.Hepatosellüler Karsinom (HCC)

Global bir temelde, her yıl primer karaciğer kanserinin 626000'den fazla yeni olgusu vardır ve her yıl bu kanserden 598000 kişi ölür (82). Kanser ölümlerinin 3. En sık nedenidir. HCC vakalarının %82'si güneydoğu Asya ve Afrika toplulukları gibi

kronik Hepatit B Virüs enfeksiyonunun yüksek oranlı gelişen toplumlarda oluşur. Bütün HCC vakalarının %52'si Çin'de oluşur. Başlıca HBV ve HCV enfeksiyonuna bağlı, 1993-1998 arasında A.B.D 'de karaciğer kanserinin insidansında %25'lik bir artış olmuştur. 2,4/1'lik bir oranla erkek baskınlığı mevcuttur.

2.4.2.Patogenez

HCC ile ilişkilenmiş 4 büyük etyolojik faktör vurgulanmıştır: kronik viral enfeksiyon (HBV, HCV), kronik alkolizm, nonalkolik hepatosteatoz (NASH) ve besinle bulaşanlar (primer olarak aflatoksin). Diğer durumlar: Tirozinemi, glikojen depo hastalığı, hereditör hemokromatozis, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ve $\alpha 1$ antitripsin eksikliğini içerir. Genetik faktörler, yaş, cinsiyet, kimyasallar, hormonlar ve diyet gibi çoğu faktörler HCC'un gelişiminde etkileşirler.

HCC'nin patogenezi alkolizm, nonalkolik steatohepatit, kronik HCV enfeksiyonu ve hemakromatozun daha yaygın olduğu batılı ülkelerde düşük insidansa göre HBV'ün yaygın olduğu populasyonlarda yüksek insidansla farklı olabilir.

Yüksek prevalans bölgesinde HBV enfeksiyonu yetişkinlik çağı ile birlikte HCC gelişimi için 200 kat artmış bir risk oluşturan infekte annelerinden virusun vertikal geçişi ile başlar. Bu hastaların yarısı kadarında Siroz (S) olmayabilir ve kanser 20, 40 yaşlar arasında oluşmuş olabilir. HBV'ün yaygın olmadığı batı ülkelerinde genellikle diğer karaciğer hastalıklarının çerçevesinde HCC vakalarının %75-90'ında bulunmaktadır. Böylece siroz batı toplumlarında HCC'nin çıkmasına katkıda bulunan bir gereklilik olduğu görülür, fakat endemik alanlarda gelişen HCC gelişiminde farklı bir role sahip olabilir. Çin'de ve güney Afrika'da, HBV'ün endemik olduğu yerlerde yer fıstığı ve tahıllarla kontamine olan fungus *Aspergillus Flavus* ile oluşmuş toksin bir toksin aflatoksine maruziyet de olabilir. Aflatoksin sellüler DNA ile birlikte kovalent olarak bağlanabilir ve p53'ün kodon 249'da spesifik bir mutasyona neden olur.

Bununla birlikte karsinogenezin ilk mekanizması bilinmemekle birlikte, birkaç durumdan bahsedilmektedir. Nedenlerden biri kronik hepatitte olduğu gibi hücre ölümü ve rejenerasyonun tekrarlayan siklusu HCC'nin patogenezinde önemlidir. Hücre bölünmesinin devam eden siklusu esnasında mutasyonların toplanmasının DNA onarım mekanizmalarını hasara uğratabildiği ve en sonunda hepatositleri dönüştürdüğü düşünülmektedir. HCC'a güçlü progresyon KRAS ve p53 gibi seçilmiş

sellüler genler de nokta mutasyonlarından ve c-MYC, c-MET (Hepatosit büyüme faktörü reseptörü), TGF- α ve insülin benzeri büyüme faktörü 2 'nin oluşturuca ekspresyonundan sonuçlanır. Son global gen ekspresyon çalışmaları HCC'nin yaklaşık %50'sinin WNT veya AKT yolaklarının aktivasyonu ile ilişkileneş olduğunu açıklamaktadır. Tümörlerin bir subgrubu fetal karaciğerde bulunan ve karaciğer progenitör hücreleri genlerin büyük bir kısmını ekspresse eder, bu da bazı HCC'ların karaciğer kök hücresinden gelebileceğini düşündürmektedir.

HBV ile infekte olmuş bireylerde tümör hücrelerinin moleküler analizi dönüştüren bir durumu başlatan veya eşlik eden viral integrasyonu düşündüren HBV DNA integrasyon patternini yansımasıyla klonaldır. HBV'de virüs integrasyonu ile nedenlenmiş sadece hücre genomunun kesintiye uğraması değil karsinogenezi etkilemiştir, fakat integrasyon alanı da önemli olabilir. İntegrasyon alanına bağlı, HBV integrasyonu tümörögenesisiteyi oluşturan protoonkogenleri aktive edebilir. Alternatif olarak hücre transformasyonunun kuvvetli ana nedeni multiple genlerin transkripsiyonel bir aktivatörü olan HBV X-protein temin edilmiştir. Bağlantılı olarak, HCV karsinogenezi mekanizmaları daha belirsizdir. HCV DNA'yı kesintiye uğratmayan bir RNA virüsüdür ve onkogenik protein üretmez. Bununla birlikte HCC'un gelişiminde etkili olabilen HCV kor ve NS5A proteinlerin göstergeleri vardır (83). Endemik alanlarda HBV'e karşı çocukların uluslararası aşılması HBV infeksiyonunun ve muhtemelen HCC'nin insidansını belirgin olarak azaltabilir.

Son yıllarda yapılan epigenetik araştırmalarda, HCC gelişiminde mikroRNA'nın rolü üzerinde durulmuştur. MikroRNA'lar (miRs), 19-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan tek zincirli RNA'lardır ve posttranskripsiyonel ve/veya translasyonel seviyelerde çoğu hedef genlerin ekspresyonunu negatif olarak regule ettikleri düşünülmektedir ve HCC'un gelişiminde kritik bir rol oynayabileceği bulunmuştur. Ayrıca bu moleküllerin tanı ve tedavinin yönlendirilmesi için birer potansiyel biomarker olup olmadığı konusuna odaklanılmaktadır (84).

2.4.3.Morfoloji

HCC makroskopik olarak: 1. Bir unifokal (genellikle büyük) kitle , 2. Multifokal değişik büyüklüklerde genişçe dağılmış nodüller veya 3. Genişçe ve bazen bütün karaciğeri tutan diffüz infiltratif kanser. Her üç pattern de karaciğerde büyümeye

neden olabilir. Diffüz infiltratif tümör sirotik bir karaciğer zemininde fark edilemeyecek kadar dağılabilir.

HCC, genellikle çevreleyen karaciğerden daha soluktur ve bazen safra sekresyonu yeterli iyi diferansiye hepatositleri içerdiğinde yeşil bir görünüm alır. HCC'ların tüm vakaları vasküler invazyon için güçlü bir eğilime sahiptir. Yaygın intrahepatik birbirini izler ve tek tük tümörün uzun ve yılan benzeri kitleleri portal veni (porta sirkülasyonun tıkanıklığı ile birlikte) veya kalbin sağ tarafına bile uzanabilen inferior vena cava'yı invaze edebilir. HCC, açıkça yan yana büyüme ve ana tümörden geldiği moleküler yöntemlerle gösterilebilen satellit nodüllerin gelişimi ile karaciğer içinde genişçe yayılır. Karaciğer dışına yayılım özellikle hepatik ven sistemine olmak üzere primer olarak vasküler invazyon yoluyla, fakat hematogen metastazlar özellikle akciğer metastazı hastalığın geç evresinde oluşmaya eğilimlidir. Perihilar, peripankreatik ve paraaortik nodlara lenf nodu metastazı eğer venöz invazyonlu HCC karaciğer transplantasyonu vakalarında karaciğer yakınına yayılmış olan HCC'un yarısından daha azında bulunmaktadır, tümör rekürrensi transplante edilmiş donör karaciğerinde oluşmaya eğilimlidir.

HCC'ler iyi diferansiyeden yüksek oranda anaplastik andiferansiye lezyonlara sıralanır. Trabeküler veya asiner , psödoglandüler bir patternde yerleşmiş hücreler hepatositik bir orijinde iyi ve orta diferansiye olarak tanımlanır. Az diferansiye tümör formunda, çok sayıda anaplastik dev hücrelerle pleomorfik bir görünüm alabilir, bütünüyle andiferansiye olabilir veya iğsi hücreli bir sarkoma bile benzeyebilir.

2.4.4.Klinik Özellikler

HCC'un klinik bulguları karakteristik olarak seyrek ve batı toplumunda sıklıkla altında yatan siroz ve kronik hepatit ile ilişkilenmiş olmasıyla maskelenmiştir. Tropikal Afrika gibi yüksek insidans alanlarında, vakalar genellikle karaciğer hastalığının klinik öyküsü yoktur, bununla birlikte otopside siroz tespit edilebilir. Her iki popülasyonda çoğu hastalar kırıklık, yorgunluk, ağırlık kaybı, abdominal kitle veya hassasiyet gibi hastalık bulguları hissedebilir. Çoğu vakalarda büyümüş karaciğer sirozdan farklı olarak yeterli nodularite ve irregularite ile birlikte palpasyonda fark edilebilir. Sarılık, ateş ve gastrointestinal veya özefageal varis kanaması değişmez bulgulardır.

Laboratuvar alışmaları faydalı olabilir, fakat seyrekçe kesindir. Serum α -feto proteinin yükselmiş seviyeleri HCC'li olguların %50'sinde bulunur. Bununla birlikte, yolk-sac tümörlerle, siroz, masif karaciğer nekrozu (kompensatuvar karaciğer hücre rejenerasyonu), kronik hepatit (zellikle hepatit C enfeksiyonu), normal doğum, fetal distress veya ölüm ve anensefali ve spina bifida gibi fetal nöral tüp defektlerini içeren çoğu nonneoplastik durumlar ile yalancı pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. α -feto protein ve diğer proteinler (carcinoembriyonik antijen seviyeleri) için laboratuvar testi HCC'un küçük lezyonları için yetersiz kalır. Son zamanlarda Glipycan-3 displastik nodülden erken HCC'un ayırımında kullanılmıştır. Küçük tümörlerin saptanmasında en değerli ultrasonografi, komputarize tomografi ve manyetik rezonans gibi görüntüleme çalışmalarıdır. HCC'un moleküler analizi aktif olarak izlenmektedir ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesine yardım edebilen yeni HCC klasifikasyonlarına yol aması daha muhtemeldir (85).

2.4.5.Tedavi

Tedavi edilmemiş karaciğer hücre karsinomunun genel ortalama hayatta kalma oranı yaklaşık 4 aydır ve genel 5 yıllık hayatta kalma oranı Birleşik devletlerde sadece %3'dr (86). Ölümün en büyük nedeni hepatik yetmezlik ve gastrointestinal kanamadır. Bazen terminal neden spontan rüptür veya lokalize submassif karaciğer hücre nekrozudur. Bazı istisnai örneklerde, HCC'ların spontan regresyona gittiği görülmüştür (87).

HCC'un en etkili tedavisi, en uzun hayatta kalma oranı ile komplet rezeksiyondur. Japonya'dan çok sayıda raporlar, eğer tümör erken safhada tanı almış ve eksize edilmişse iyi bir kr şansına sahip olduğuna işaret etmektedir. Japon karaciğer kanser çalışma grubu 297 vakanın 25'inde 17 yıldan daha fazlalık bir hayatta kalma oranı bulmuşlardır. Diğer merkezler, %25 ile %65 arasında sıralanan 5 yıllık hayatta kalma oranları rapor etmişlerdir (88). Son zamanlarda, tümörlerin büyük bir kısmı karaciğer transplantasyonu ile tedavi edilmektedir; Bu teknikle en iyi sonuçlar küçük soliter tümörlerde elde edilmiştir (89).

Sistemik veya arteriyel kemoterapi inoperabl veya rekürrent tümörlerde orta derecede bir palyasyon oluşturabilir (90). Transkatater hepatic arteriyel embolizasyon da kullanılabilir ve yaygın tümör nekrozu ile sonuçlanabilir. Özellikle küçük lezyonlar

için ; Tümörler belirgin kalınlaşmış bir kapsül gelişimi ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir (91).

2.4.6.Prognostik Parametreler

- **Stage:** En önemli prognostik parametreyi oluşturur (Tablo 3), (92).
- **Çap:** Çoğu serilerde küçük tümörlü vakalar (2 cm'den 5 cm'ye) önemli oranda daha iyi bir prognoza sahiptir. 1000 kişilik bir çalışmada 5 cm'den küçük tümörlerin 5 cm ve daha büyük tümörlere göre daha yüksek bir rezeksiyon başarısına ve hayatta kalma oranına sahip olduğu bulunmuştur (93).
- **Enkapsulasyon:** Bir kapsül ile total olarak çevrelenmiş HCC'ların bu özelliğe sahip olmayanlara göre daha az agresif olduğu düşünülmektedir (94).
- **Tümör odaklarının sayısı:** Tek lezyonların multipl lezyonlara göre daha uzun hayatta kalma ile ilişkilendirilmiş olduğu gösterilmiştir. İtalya'da yapılan 100 kişilik bir çalışmada **glutamic-oxaloacetic transaminase, gamma-glutamyl transferase, alfa-fetoprotein, tümör nodüllerinin sayısı , cerrahi sınırların genişliği, preoperatif kemoembolizasyon** hayatta kalma için bağımsız prognostik faktörler olarak belirlenmiştir (95).
- **Portal ven tutulumu:** Bu bulgu önemli bir kötü prognostik parametre olarak belirlenmiştir. Japon kanser çalışma grubunu tarafından yapılan 5800 vakalık bir çalışmada, **alfa-feto protein seviyeleri, tümör çapı, tümör odak sayısı, eşlik eden siroz, yaş, cerrahi kurabilite ile birlikte portal ven tutulumunun bağımsız** prognostik parametreler olduğu bulunmuştur (96).
- **Mikroskopik Tip:** Fibrolamellar varyant belirgin olarak daha iyi bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Diğer morfolojik varyantlarla prognoz arasında korelasyon bulunamamıştır (97).
- **Mikroskopik özellikler:** Kür için rezeke edilmiş HCC'lu 425 vakalık çok merkezli bir çalışmada, hayatta kalma için bulunmuş bağımsız belirteçler olan mikroskopik özellikler, **vasküler invazyon, yüksek nükleer grade ve mitotik aktivitedir.** Bu uzanımda mitotik indeksin prognostik değeri diğer çalışmalarla da gösterilmiştir (98).

- **Sirozun varlığı:** Siroz ile ilişkilenmiş karsinomlar, belki de daha küçük bir fonksiyonel korunmanın ve sıklıkla geniş yayımlı tümör tutulumunun kombinasyonu nedeniyle kötü bir prognoza sahiptir. Bu çalışma 804 sirozlu ve sirozlu olmayan olgular arasındaki kliniko-histopatolojik ve hayatta kalma oranları karşılaştırılarak yapılmıştır. Sirozlu olmayan HCC'lu olguların, olanlara göre daha uzun bir hayatta kalma oranına sahip olduğu bulunmuştur (99).

- **Cinsiyet ve yaş:** Çoğu seride, bu parametrelerle prognoz arasında ilişki bulunamamıştır. Bununla birlikte son bir çalışma kadın cinsiyetli olgularda prognozun daha iyi olduğu gösterilmiştir (100).

- HCC olgularının iğne biopsi örnekleri üzerinde c-myc amplifikasyonu olan ve olmayanların hayatta kalma oranları karşılaştırılmış ve uygunsuz bir prognostik indikatör olduğu sonucuna varılmıştır (101).

- **Isı şok protein:** HSP-27'nin ekspresyonu tümör grade ve hayatta kalma ile ilişkilenmiştir.

Tablo 4 .Hepatosellüler Karsinomda düzeltilmiş TNM klasifikasyonu, 2008

Sınıflama Parametreleri	Tanımlama
Primer tümör	
Tx	Tm saptanamaz
T0	Tm yok
T1	Solter tm/vasküler invazyon yok
T2	Solter tm/vasküler invazyon var veya boyut $\leq$ 5cm olan multiple tm
T3	Multiple tm / $>$ 5 cm veya portal veya hepatik venin majör dalını invaze eden soliter tm
T4	Safra kesesi dışında komşu organ invazyonu (tek veya multiple tm) veya viseral periton perforasyonu
Bölgesel LN	
Nx	Değerlendirilemez
N0	LN metastazı yok
N1	Bölgesel LN metastazı var
Uzak metastaz	
Mx	Değerlendirilemez
M0	Uzak metastaz yok

M1	Uzak metastaz var
Evre	
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
IIIA	T3, N0, M0
IIIB	T4, N0, M0
IIIC	Herhangi T, N1, M0
IV	Herhangi T ve N, M1
Histolojik evre	
GX	Değerlendirilemez
G1	İyi differansiye
G2	Orta differansiye
G3	Kötü differansiye
G4	Undifferansiye
Fibrozis skoru F0	Fibrozis skoru 0 -4 (fibrozis yok – orta derecede fibrozis)
F1	Fibrozis skoru 5-6 (şiddetli fibrozis – siroz)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Araştırmanın Tipi

Bu çalışma yarı deneysel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, Özel Güneş Patoloji laboratuvarında 28.12.2011 ile 12.06.2013 tarihleri arasında gerçekleşmiştir.

3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışma, 2004-2013 yılları arasında Özel Güneş Patoloji Laboratuvarına başvurmuş, 46-86 yaş arası, 15'i kadın, 5'i erkek, Safra Kesesi Adenokarsinom tanılı 20 olgunun; 2011 yılına ait Özel Mikro Patoloji Laboratuvarına başvurmuş, 46-81 yaş arası, 10'u kadın, 15'i erkek Pankreatik Adenokarsinom tanılı 25 olgunun; 51-88 yaş arası 1'i kadın, 7'si erkek Hepatosellüler Karsinom tanılı 8 olgunun rezeksiyon sonrası ameliyat materyallerinin parafin blokları üzerinden yapılmıştır.

3.4.Araştırmanın Materyali

Bu olguların ulaşılabilen klinik ve patolojik bilgileri, patoloji laboratuvarı veri tabanından elde edilmiş olup, raporlar üzerinden tablollaştırılarak derlenmiştir. Olgulara ait preparatlar, lam arşivinden çıkarılarak tekrar incelenmiş ve patolojik bulgular teyit edilmiş, ayrıca tümör bulunan preparatlar immünhistokimyasal inceleme için seçilmiştir. Sonraki aşamada, ayrılan preparatlara ait parafin bloklar, blok arşivinden çıkarılmıştır. Seçilen parafin bloklar mikrotom eşliğinde 5 mikron kalınlığında lizinli lamlara kesilerek preparatlaştırılarak immünhistokimyasal incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri

Safra kesesi Adenokarsinom olguları için bağımsız değişkenler; Yaş, cinsiyet, tümör çapı, differansiyasyon, tümör grade'i, evre, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyondur.

Pankreatik Adenokarsinom olguları için bağımsız değişkenler; Yaş, cinsiyet, tümör çapı, differansiyasyon, evre, lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon, ulaşılabilen olgular için uzak metastaz ve hastalıksız sağ kalım süreleri'dir.

Hepatosellüler Karsinom olguları için bağımsız değişkenler; Yaş, cinsiyet, tümör çapı, differansiyasyon, vasküler invazyon, nükleer grade, mitotik aktivite, ulaşılabilen olgulara ait uzak metastaz ve hastalıksız sağ kalım süreleri'dir.

Çalışmanın bağımlı değişkenleri; Çalışmaya alınan Safra Kesesi Adenokarsinom, Pankreatik Adenokarsinom, Hepatosellüler Karsinom olgularının tümör kesitlerine immünohistokimyasal olarak uygulanan FOXP-3, CD4, CD8'in intratümöral ve peritümöral yoğunlukları, intratümöral FOXP-3/CD4 ve peritümöral FOXP-3/CD4 oranları'dır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araç ve Gereçler

3.6.1.1. Tez çalışmasında kullanılan gereçler

- Hazır parafin bloklar
- Lam.....İSOLAB
- Lamel.....İSOLAB
- Mikrotom.....Leica RM 2125 RT
- Mikrotom bıçağı.....Feather S35
- Su banyosu.....DiaPath
- Polilizinli lam.....İSOLAB
- Etüv.....Elektromag M1420
- Mikrodalga fırın.....Beko MD1510
- Sınırlayıcı kalem.....DAKOpen
- +4 °C Buzdolabı.....Profilo BO2202TE

- Ependorf.....Minispin
- Plastik pipet ucu sarı-mavi.....Barier100
- Pasteur pipet.....İSOLAB
- Boyama cihazı.....Leica ST4040
- Mikroskop.....Olimpus CX-21

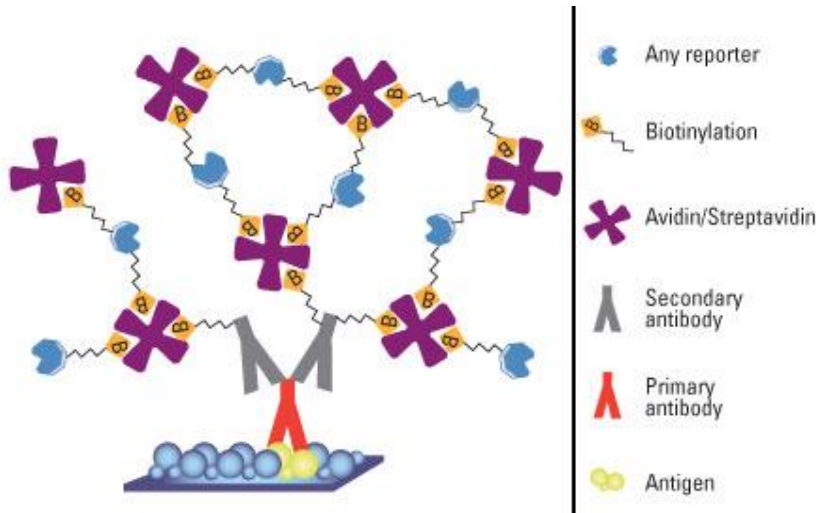
3.6.1.2.Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Xylene
- Etil alkol %96'lık
- Distile su
- pH: 6 Sitrat tampon solüsyonu (Diapad)
- % 3'lük Hidrojen peroksit (Analiz Kimya)
- TRİS 11.1 gr.+940 gr. Bidistile su+ 7 ml HCl, pH:7.2
- Süper blok solüsyonu (ScyTec lab 800-729-8350 125 mlt. 26483)
- Antibody Diluent (Spring-Bioscience ADS-5125 LOT: 110729)
- Anti-hum Foxp3 Purified (eBioscience, Clone: 236/E7,Cat No:14-4777)
- CD4 (Novocastra Lyophilized Monoclonal Mouse Antibody, Pro.code:NCL-CD4-1F6)
- Rabbit monoclonal anti-CD8 (Diagnostic Biosystems, (5F10): sc-70794)
- AntiPolyvalent Biotinylated Antibody (Sensitec, ABF 125, LOT:26543)
- Streptoavidin (ScyTek ABG-125 LOT: 26544)
- DAB Substrat chromogenic Kit (ScyTek lab. ACC-125 LOT: 26169)
- Hemotoxylen & Eosin solüsyon

3.7. YÖNTEMLER

3.7.1.Genel İlke

İmmünohistokimyasal testler; antijen-antikor tepkimelerinin kullanıldığı tanısal testlerdendir. Bu test, hücre ve doku antijenlerini, bunlara karşı geliştirilmiş ve değişik maddelerle işaretlenmiş antikorlarla karşılaştırılarak, mikroskopik olarak görünür hale getirmeyi amaçlar. İHK testlerde kullanılmak üzere geliştirilen ve genellikle IgG tipinde olan monoklonal antikorlar doku ile karşılaştırılır. Ardından, bir başka deney hayvanından bu antikorları üreten deney hayvanına karşı antikor yaptırılır ve sekonder antikorlar kromojeni aktive edecek bir enzimle işaretlenir. İndirekt olarak nitelenen testlerden olan Avidin-biotin kompleks (ABC) sisteminde ise sekonder antikor enzimle işaretlenmez. ABC yöntemi, yumurtanın akındaki bir glikoprotein olan avidin biotin vitaminine ilgisine dayanarak geliştirilmiştir (Şekil 4). ABC sistemi antijen-antikor arasında birkaç milyon kattan fazla kalıcı bir ilişki oluşturur. Avidine benzer bir molekül de Streptomyces avidinii bakterisinden elde edilir. Streptavidin denilen bu madde nötral olduğu ve karbonhidrat kompanenti taşımadığı için daha az boya artefaktına yol açar. Streptavidin biotine karşı yüksek afiniteye de sahiptir ve karbonhidratların yokluğu nedeniyle, elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak, streptavidinin daha düşük izoelektrik noktası nedeniyle nonspesifik bağlanması avidin temelli metodlardan önemli oranda daha azdır. Biotin ise hem enzimlerle hem de antikorlarla kolay bağ kurar. Enzim kompleksi testlerinde olduğu gibi primer antikorla avidin-biotin kompleksi arasındaki ilişkiyi sekonder antikorlar sağlar. Eğer dokuda antijen yoksa antikor bağlanmayacak ve yıkanmalar sırasında atıldığından boyanma olmayacaktır.



Şekil 4. Avidin-biotin kompleks (ABC) boyama yönteminin şematik gösterimi

3.7.2.Uygulama basamakları

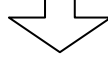
- İHK için manuel yöntem uygulandı.
- Lizinli lamlara, olgulara ait demonstratif bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitler 1 gece 60 °C'lik etüvde bekletildi.
- 1 saat süreyle ksilen içerisinde oda ısısında bekletildi.
- Konsantrasyonu giderek azalan (%96, %80, %70) etil alkol serilerinden geçirildi.
- Distile suda 10 dakika yıkandı.
- Sitrat tampon (pH:6) içerisinde, 10'ar dakikada bir distile su ekleyerek 30 dakika süreyle mikrodalga fırında 400 W sıcaklıkta ısıtıldı. Bu işlem bütün antikorlar için (Foxp3, CD4,CD8) uygulanmıştır.
- Oda ısısında soğuyuncaya dek beklendi.
- Distile suda 10 dakika yıkandı.
- Hidrojen Peroksitte 15 dakika tutuldu.
- Tris (pH:7.4) içinde 10 dakika bekletildi
- Lamlar üzerindeki dokular sınırlayıcı kalemle çevrelendi.
- İHK'sal boyamada indirekt ABC yöntemi uyguladı.
- Superblock Blokan solüsyonda 5 dakika bekletildi.
- Anti-Human Foxp3 antikoruna +4-8 °C'de bekletilmektedir. Antikor purifiye solüsyon şeklinde olup, antikor dilüsyon solüsyonu ile 1/50 oranında dilüe edilerek hazırlanmaktadır.

- CD8 antikoruna +4-8 °C’de bekletilmektedir. Antikor purifiye solüsyon şeklinde olup, antikor dilüsyon solüsyonu ile 1/100 oranında dilüe edilerek hazırlanmaktadır.
- CD4 antikoruna +4-8 °C’de bekletilmektedir. Antikor liyofilize toz halinde olup, 1mlt distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Önerilen dilüsyon oranı 1/20-40 olmasına rağmen, antikor uzun süre bekletilmiş olduğundan boyanma olmaması sebebiyle, antikor dilüsyon solüsyonu ile 1/10 oranında dilüe edilerek hazırlanmaktadır.
- Hazırlanan primer antikorlardan anti-FOXP-3 ile anti-CD8 damlatılması yıkama yapılmadan, nemli ortamda gece inkübasyonu yöntemiyle 1 gece bekletilerek yapılmıştır. CD4 antikoruna ise damlatıldıktan sonra nemli ortamda 1,5 saat bekletilerek yapılmıştır.
- Tris (pH:7.4) içinde 10 dakika bekletildi.
- Anti polivalent biotinli antikor oda ısısında 30 dakika uygulandı.
- Tris (pH:7.4) içinde 10 dakika bekletildi.
- Streptavidin solüsyonu oda ısısında 30 dakika uygulandı.
- Tris (pH:7.4) içinde 10 dakika bekletildi.
- DAB, hidrojen peroksitli hazır solüsyonu ile 1/20 oranında sulandırıldı ve lamla üzerinde 10 dakika tutuldu.
- Distile suda yıkandı.
- Harris hematoksilen ile 15 saniye zemin boyama yapıldı.
- Akar çeşme suyunda yıkandı.
- Konsantrasyonu giderek artan (%70,%80,%96) etil alkol serilerinden geçirilip havada kurutuldu.
- Ksilen içinde 30 dakika bekletildi ve kapama maddesi damlatılıp lamelle kapatıldı.

- Boyalı preparatlar ışık mikroskopisi ile değerlendirildi.

3.8.Araştırma planı ve takvimi

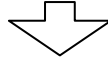
28.05.2009 tarihinde “Hepatopankreatobilier kanserlerde regülatör T hücrelerin dağılımı ve prognostik önemi” isimli projenin yazılması ve 23.07.2009 tarihinde DEÜ Tıp Fakültesi Dekanlığından etik onayın alınması



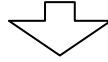
Safra kesesi, Pankreas ve Karaciğer karsinom olgularının laboratuvar kayıtlarından tespit edilmesi, arşiv çalışması yapılarak olgulara ait parafin blokların ve H&E preparatlarının çıkarılması ve prognostik parametrelerin derlenmesi (2009-2011 arası)



İmmünohistokimyasal çalışma için gerekli malzemelerin temini, İHK için olgulara ait uygun preparatların hazırlanması (28.12.2011-12.06.2012 tarihleri arasında)



İHK boyamaların yapılması, değerlendirilmesi ve diğer prognostik parametrelerle birlikte tablollaştırılması (12.06.2012- 12.12.2012 tarihleri arasında)



Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi, literatür bilgilerinin derlenmesi, tezin yazılması (12.12.2012-30.10.2013 tarihleri arasında)

3.8.Verilerin değerlendirilmesi

3.8.1.İmmünohistokimyasal verilerin değerlendirilmesi

İHK bulguların değerlendirilmesinde, nükleer boyanma oluşturan FOXP3, sitoplazmik boyanma oluşturan CD4 ve CD8'in, intratümöral ve peritümöral olarak, 5'er alanda 40'lık büyük büyütme ile pozitif boyanan hücrelerin sayılması yolu kullanılmıştır. *Intratümöral alanlar değerlendirilirken*, solid veya asiner yapıdaki tümör alanlarında bitişik iki tümör hücresi arasında pozitif immünreaktivite dikkate alınmıştır. Peritümöral alanlar değerlendirilirken, tümör çevresi stromal alanlardaki pozitif immünreaktivite dikkate alınmıştır.

3.8.2.İstatistiksel Verilerin değeriendirilmesi

Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğer kanser olgularının intratümöral ve peritümöral alanlardaki sayısal miktarlarının istatistiksel farkı Paired sample t testi ile değeriendirilmiştir.

3.9.Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın ilk 6 aylık döneminde olgulara ait bilgilerin derlenmesinde bazı aksaklıklar yaşanmıştır. Olgulara ait parafin blokların arşivden bulunması sırasında olguların 2004-2005 yıllarına ait olanların tahrip olması, dokuların alınmış seri kesitler nedeniyle küçülmüş olmaları preparatlaştırmakta zorluklarla karşılaşılmıştır.

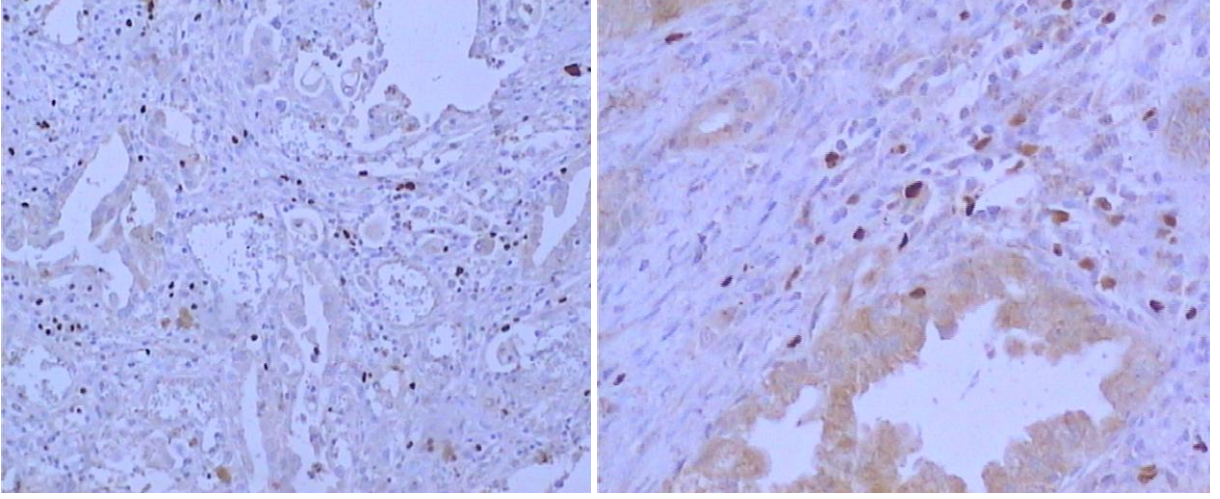
Özellikle Safra Kesesi vakalarında tümörlerin insidental olarak tespit edilmesi nedeniyle tümör boyutu, yayılım derecesi gibi özelliklerin tespitinde zorluklarla karşılaşılmıştır. Bu olguların bazılarının preparatları tekrar incelenerek tümör çapları kesitlerden tespit edilmiştir.

Safra Kesesi, Pankreas ve Karaciğere ait olgulara ait yaş, perivasküler invazyon, perinöral invazyon, T evresi ile olguların hastalıksız sağ kalım süreleri, metastaz bulguları gibi klinik özelliklerin derlenmesinde sınırlılıklar oluşmuştur. Bu klinik bulgular olguların klinikleriyle görüşülerek bulunmaya çalışılmış ve ulaşılanlar kayıt edilmiştir.

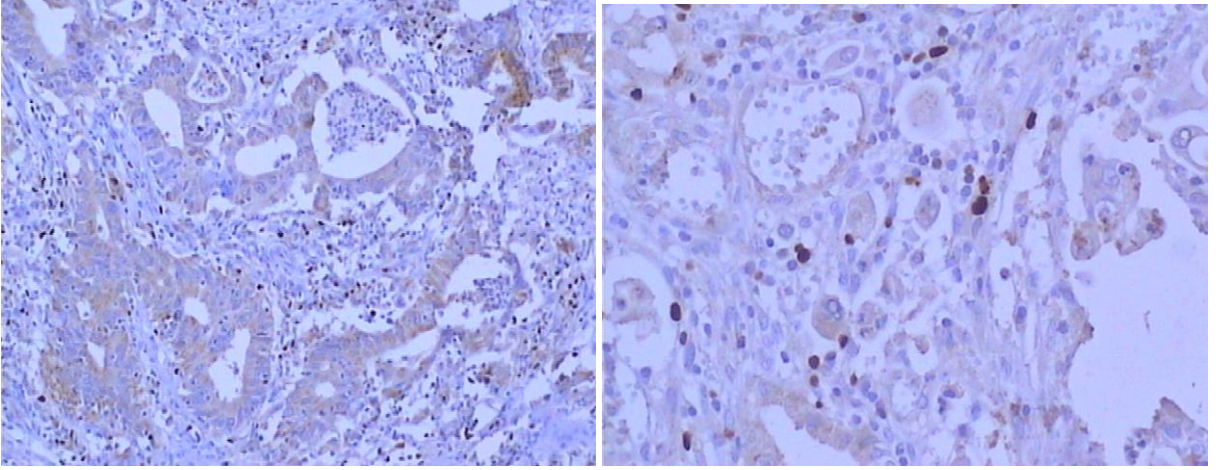
Literatürdeki benzer çalışmalar taranarak, çalışmanın yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Örneğin, intratümöral ve peritümöral alanlar değişik çalışmalarda farklı ele alınmıştır. Bunların içinden en doğru çalışmanın bulunması için titizlikle inceleme yapılmış ve en doğru yaklaşım bulunmaya çalışılmıştır.

3.10.Etik Kurul Onayı

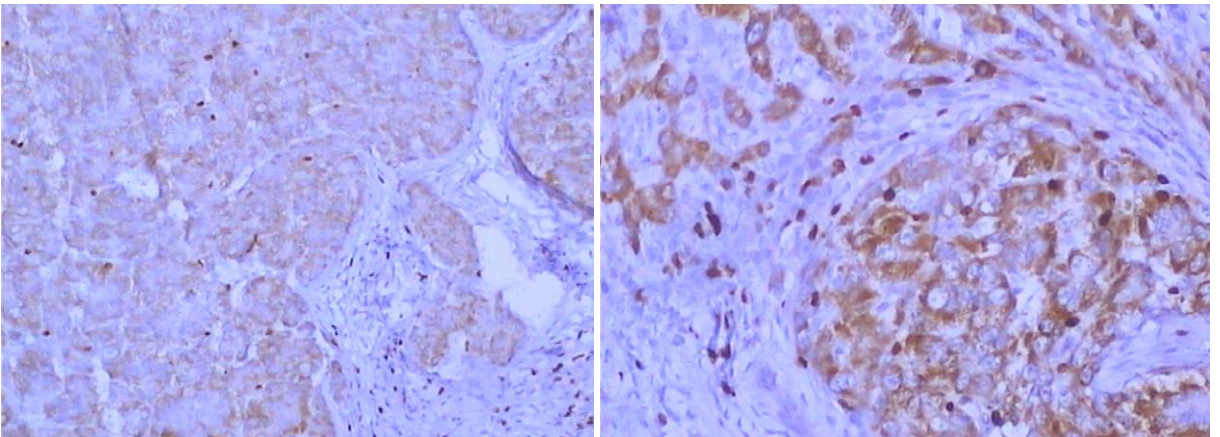
DEÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu tarafından, 23 Temmuz 2009 tarih ve 26/17/2009 nolu toplantısında; **“Hepatopankreatobilier tümörlerde düzenleyici T lenfositler ve prognostik önemi”** adındaki projemizin etik açıdan sakıncalı olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.



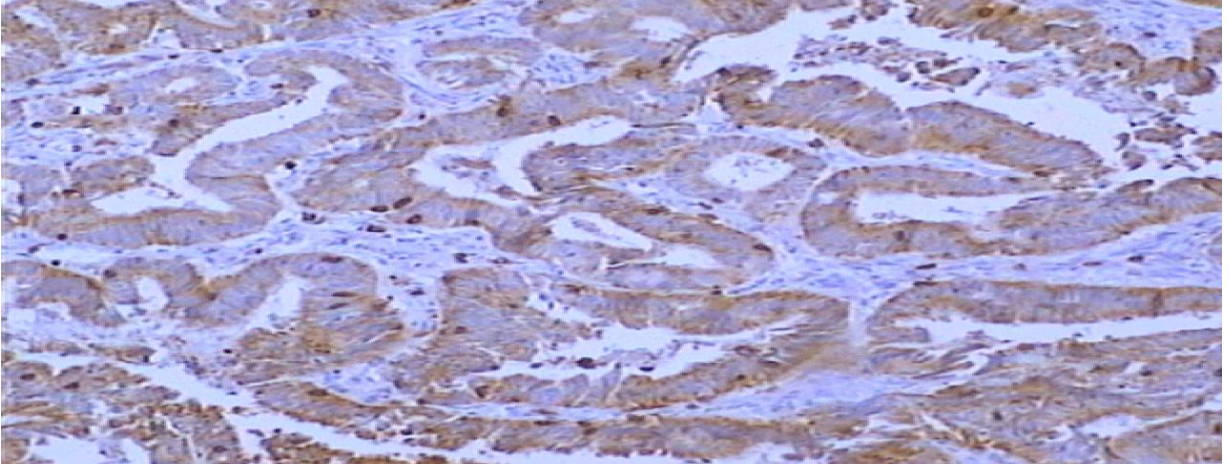
Resim 1,2: S.K. kanser olgusunda nükleer boyanma oluşturan Foxp3+ T hücreler (x10,x40)



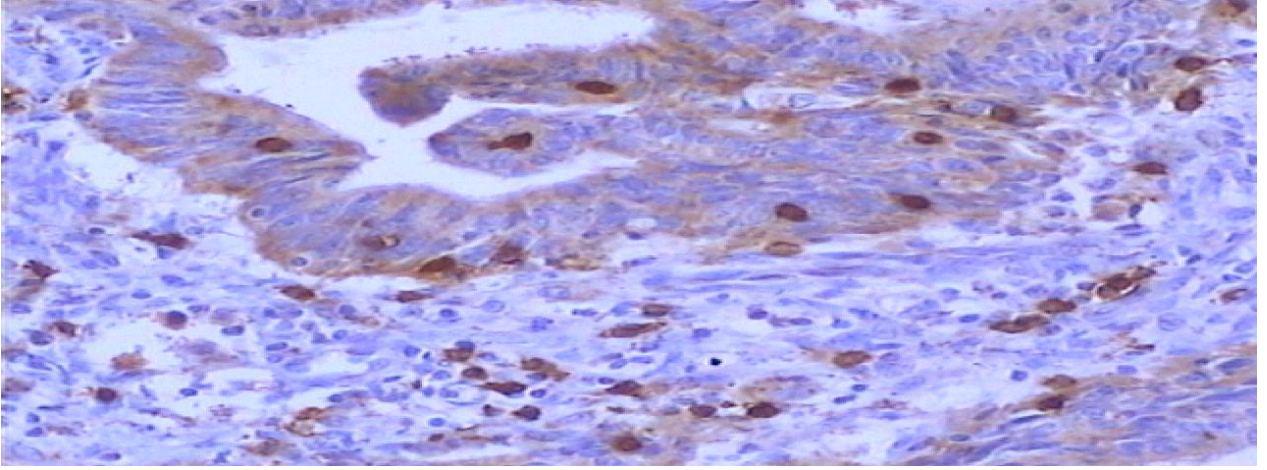
Resim 3,4: P. kanser olgusunda nükleer boyanma oluşturan Foxp3+ T hücreler (x10,x40)



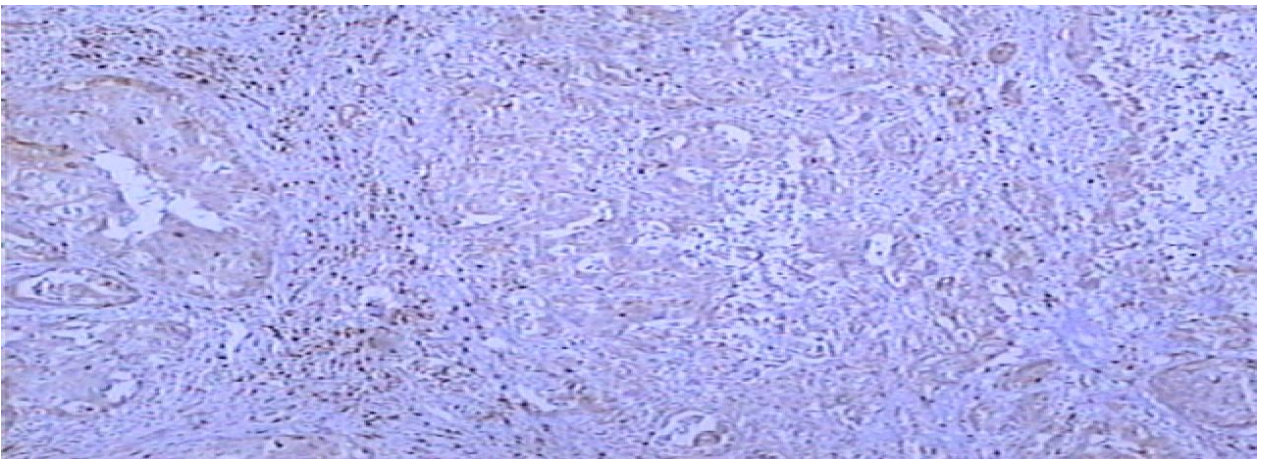
Resim 5,6: K. kanser olgusunda nükleer boyanma oluşturan Foxp3+ T hücreler (x10,x40)



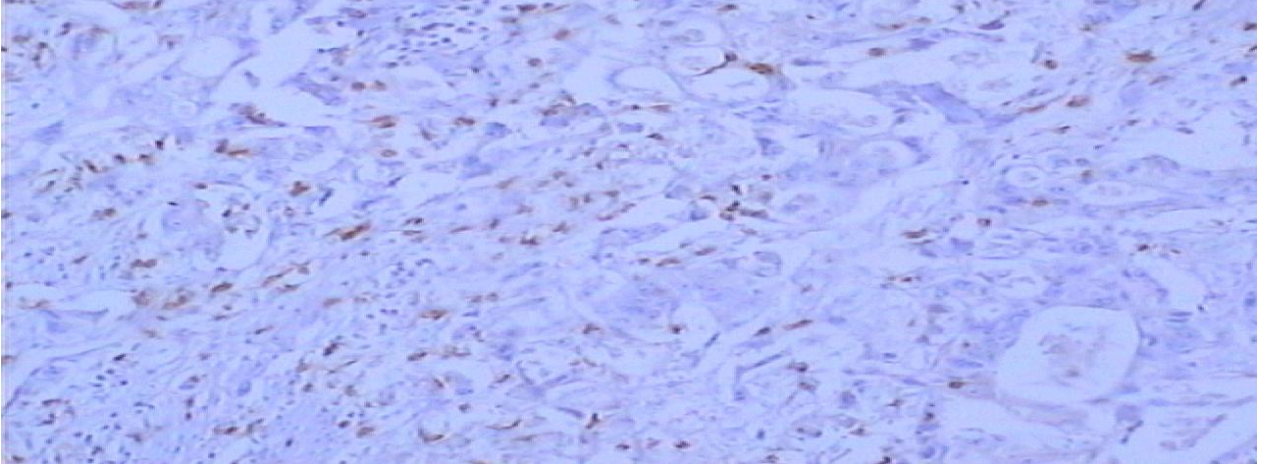
Resim 7: Safra Kesesi kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10)



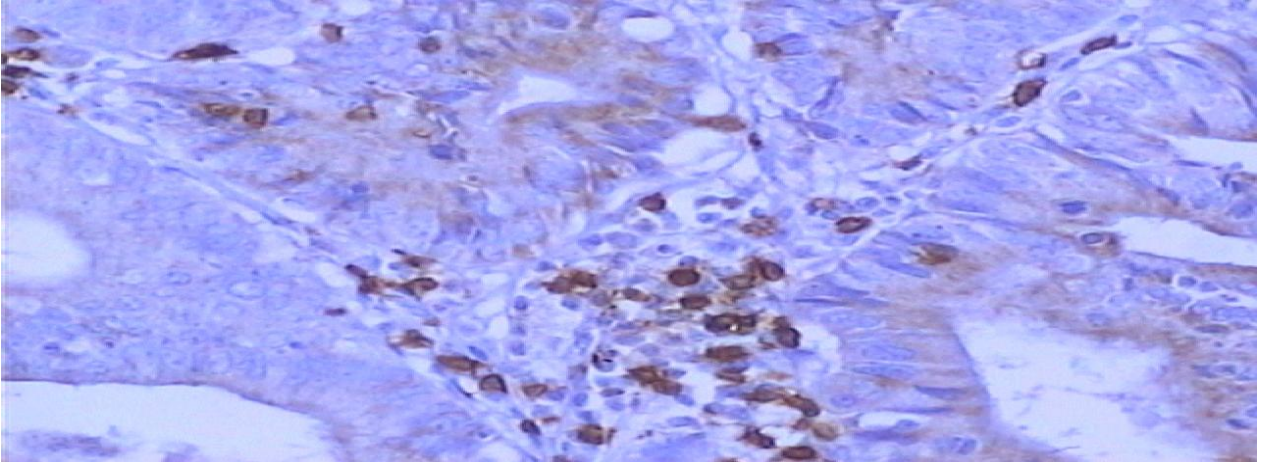
Resim 8: Pankreas kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10)



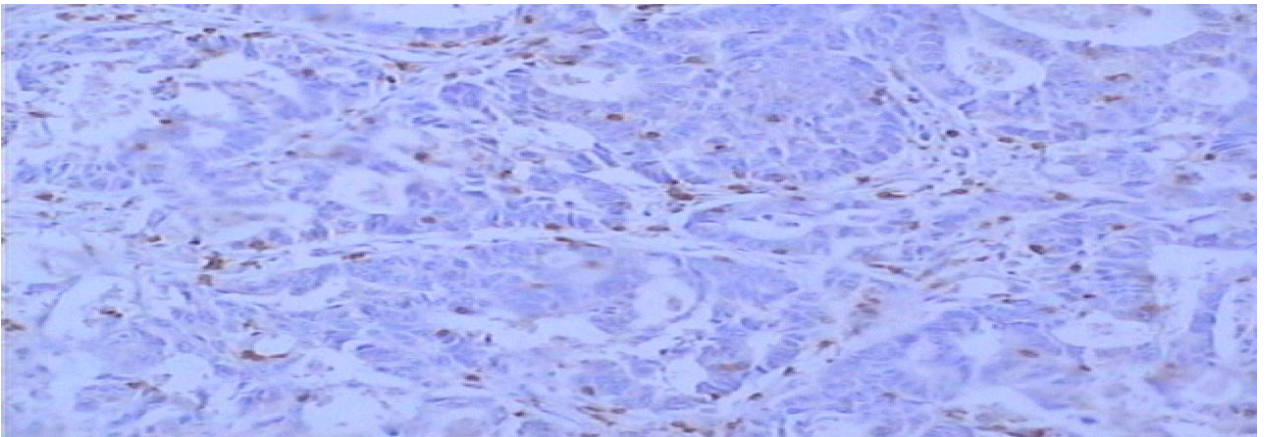
Resim 9: Karaciğer kanser olgusunda CD8+ T hücreler (x10)



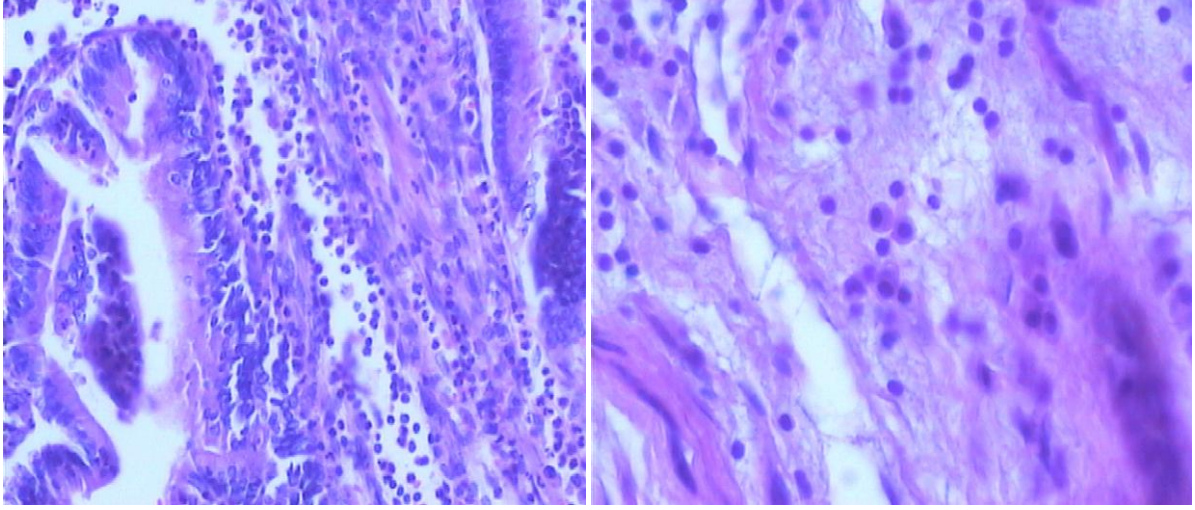
Resim10: Safra Kesesi kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10)



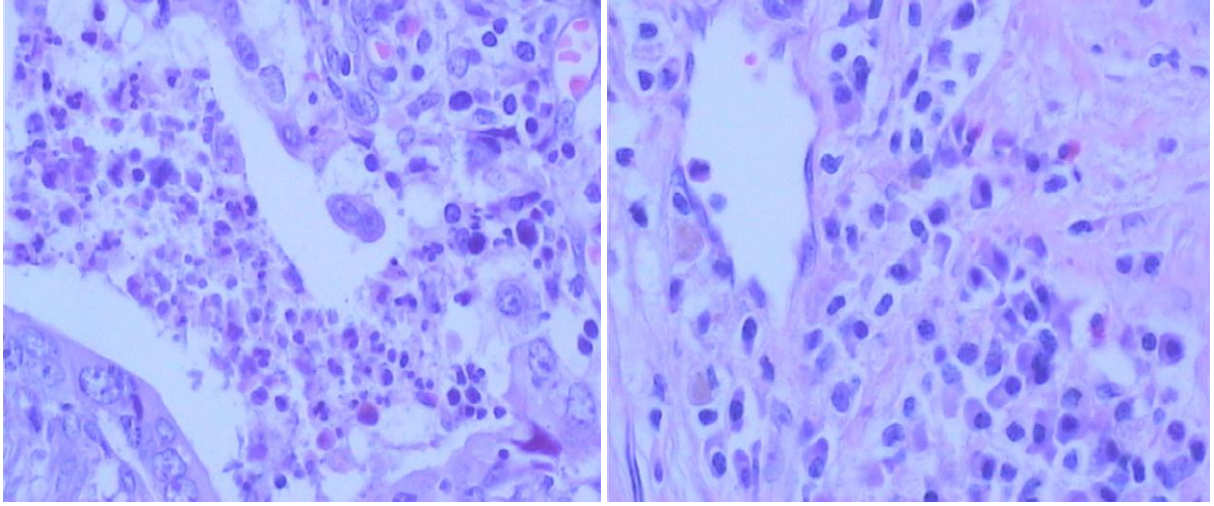
Resim11: Pankreas kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10)



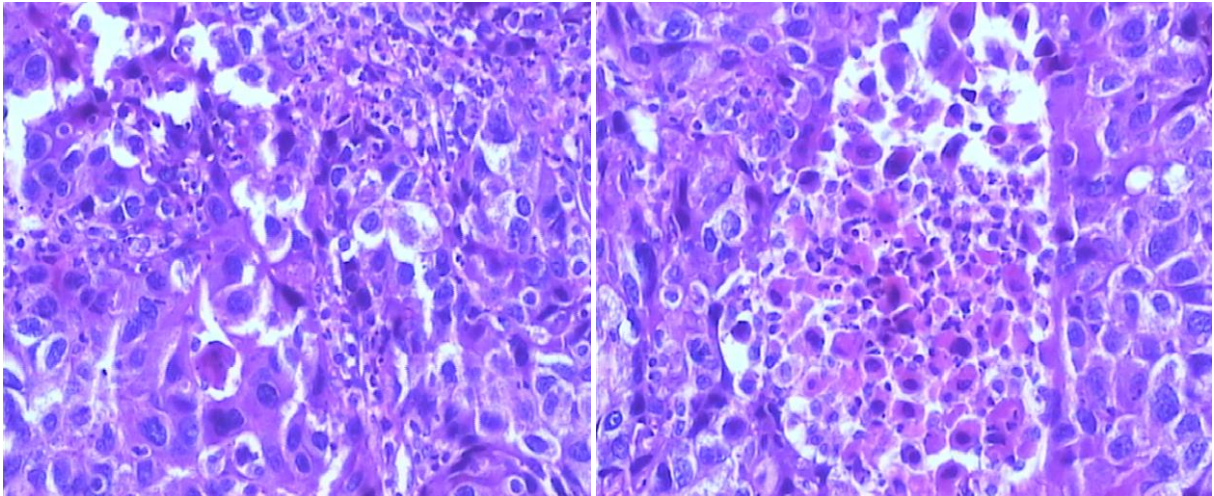
Resim12: Karaciğer kanser olgusunda CD4+ T hücreler (x10)



Resim 13,14: 2 ayrı safra kesesi olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10,x40)



Resim 15,16: 2 ayrı pankreas olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10,x40)



Resim 15,16: 2 ayrı karaciğer olgusunda tümöral nötrofil ve plazma hücreleri (x10)

4.BULGULAR

4.1.Safra Kesesi kanser olgularına genel bakış

Çalışmaya alınan 20 safra kesesi kanser olgusunun; 6'sı (%30) erkek, 14'ü (%70) kadındı. Olguların yaş ortalaması $69,50 \pm 11,153$ (46-86) idi. Olguların tümör çapı ortalama $3,290 \pm 1,8657$ (1,5 cm ile 8 cm arasında) ölçülmüştür. 2 (%10) olgu evre T1, 9 (%45) olgu evre T2, 9 (%45) olgu ise evre T3 olarak saptanmış olup, 11 (%55) olgu erken evre, 9 (%45) olgu ileri evre olarak değerlendirildi. 1 (%5) olgu grade 1, 16 (%80) olgu grade 2, 3 (%15) olgu grade 3 olarak saptandı. 14 (%70) olguda perinöral invazyon görülürken, 6 (%30) olguda perinöral invazyon görülmedi. Olguların 8'inde (%40) lenfovasküler invazyon yokken, 12 (%60) olguda lenfovasküler invazyon görüldü. Bilgilerine ulaşılabilen, 3 (%30) olgunun sağ olduğu, 7 (%70) olgunun ise ex olduğu saptanmış olup, 10 olgunun yaşam verisine ulaşılamamıştır. 10 Olguya ait hastaliksız sağ kalım süreleri 50 ile 3136 gün arasında (ortalama $608,00 \pm 932,641$ gün) olarak tespit edilmiştir. Stage, grade, diferansiasyon lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, yaşam-ölüm durumu hastaliksız sağ kalım gün sayısı bir arada değerlendirilerek elde edilen prognostik sınıflamaya göre olguların 11'i (%55) kötü prognozlu, 9'u (%45) ise iyi prognozlu olarak saptandı.

Safra kesesi karsinom olgularının tümör kesitlerine uygulanan İHK inceleme sonrasında 5 büyük büyütme alanındaki pozitif boyanma gösteren T hücrelerin sayılması ile elde edilen bulgular; Peritümöral alanlarda Foxp3 pozitivitesi ortalama $78,20 \pm 20,193$ (50-120), intratümöral alanlarda ise Foxp3 sayısı ortalama $15,95 \pm 2,544$ (11-21) bulunmuştur. Peritümöral alanlarda CD8 pozitif boyanan hücre sayısı ortalama $201,25 \pm 56,960$ (120-325), intratümöral alanlarda ise $43,55 \pm 5,934$ (35-56) dır. Peritümöral alanlarda CD4 pozitif hücre sayısı ortalama $247,50 \pm 55,642$ (166-375), intratümöral alanlarda CD4 ortalama $46,00 \pm 15,438$ (30-90) dır. Diğer bir bulgu; intratümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı $37,80 \pm 2,726$ (33-44), peritümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı ise $31,10 \pm 2,315$ (27-35) bulunmuştur. Tümör alanlarında ölçülen nötrofil/lenfosit oranı ortalama $\% 31,10 \pm 2,315$ (en düşük $\% 8$, en yüksek $\% 50$) dir. Benzer şekilde tümör alanlarında eş zamanlı ölçülen plazma hücresi/ lenfosit oranı ortalama $\% 8.65 \pm 5,976$ (en düşük $\% 2$, en yüksek $\% 20$) dir (Tablo 5).

Prognostik parametrelerle karşılaştırılan ortanca değere göre sınıflanan bulgular; Yaş bulgularına ulaşılan olgular arasında olguların 8'i (%50) 74 yaş altı, 8'i (%50) 75 yaş üstü olarak saptandı. Tümör çapı 10 olguda (%50) 2,5 cm'nin altında, 10 olguda (%50) 2,5 cm'nin üzerindedir. İntratümöral Foxp3 yoğunluğu ortanca değer 16'ya göre 9 olguda (%45) düşük, 11 olguda (%55) yüksek bulunmuştur. İntratümöral CD4 yoğunluğu 10 olguda (%50) medyan değer 42,5'in altında, 10 olguda (%50) 42,5'un üzerindedir. İntratümöral CD8 miktarı 9 olguda (%45) medyan değer 45'in altında, 11 olguda (%55) 45'in üzerindedir. Nötrofil/lenfosit oranı 9 olguda (%45) medyan değer 20'nin altında, 11 (%55) olguda 20'nin üzerindedir. Plazma hücresi/lenfosit oranı 9 olguda (%45) medyan değer 5'nin altında, 11 (%55) olguda 5'in üzerindedir.

Tablo 5. Safra kesesi kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları (SPSS).

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
yas	16	46	86	69,50	11,153
diameter	20	1,5	8,0	3,290	1,8657
tmicifox	20	11	21	15,95	2,544
cevrefox	20	50	120	78,20	20,193
tmicicd8	20	35	56	43,55	5,934
cevrecd8	20	120	325	201,25	56,960
tmicicd4	20	30	55	41,80	6,254
cevrecd4	20	166	375	247,50	55,642
inttmfoxcd4	20	33	44	37,80	2,726
pertmfoxcd4	20	27	35	31,10	2,315
NötlOr	20	8	50	19,90	10,988
PlazlenOr	20	2	20	8,65	5,976
Hstlkszskl	10	50	3136	608,00	932,641
Valid N (listwise)	7				

4.2.Safra kesesi kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular

Safra kesesi kanser olgularının tümör kesitlerinin IHK bulgular eşliğinde incelenmesi ve paired samples statistic yöntemi ile değerlendirilen sonuçlara göre; Peritümöral alanlar ile intratümöral alanlara Foxp3 pozitivite sayısının farkı ortalama $62,25 \pm 19,740$ (53,011-71,489) bulunmuş olup, bu değer in istatistiksel olarak anlamlı

olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD4 sayıları arasındaki fark $205,70\pm54,429$ ($180,226-231,174$) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD8 sayıları arasındaki fark $157,70\pm54,796$ ($132,055-183,345$) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki Foxp3/CD4 oranlarının sayıları arasındaki fark $6,70\pm2,993$ ($5,299-8,101$) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$), (Tablo 6).

Tablo 6. Safra kesesi kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları (SPSS).

Eşli örnek istatistikleri

		Mean	N	Std. Deviation	p value
Pair 1	tmicifox	15,95	20	2,544	,000
	cevrefox	78,20	20	20,193	
Pair 2	tmicicd8	43,55	20	5,934	,000
	cevrecd8	201,25	20	56,960	
Pair 3	tmicicd4	41,80	20	6,254	,000
	cevrecd4	247,50	20	55,642	
Pair 4	inttmfoxcd4	37,80	20	2,726	,000
	pertmfoxcd4	31,10	20	2,315	

4.3.Safra kesesi kanser olgularında T hücre, Nötrofil ve Plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması

Cinsiyet, yaş, tümör çapı, tümör T evresi, lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, yaşam durumu, uzak metastaz, stage, diferansiasyon, prognostik durum gibi prognostik parametreler ile intratümöral Foxp3, CD8, CD4 yoğunlukları, Foxp3/CD4 oranı, intratümöral nötrofil/lenfosit oranı, intratümöral plazma hücresi /lenfosit oranı istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 7). Anlamlı sonuçlar aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir;

- Düşük intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 9 olgu erken evrededir. Yüksek intratümöral FOXP3 yoğunluğuna sahip 9 olgu ileri evrede, 2 olgu erken evrededir.
- Düşük intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 9 olgu erken evrededir. Yüksek intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 9 olgu ileri evrede, 2 olgu erken evrededir.

- Düşük intratümöral CD4 yoğunluğuna sahip 10 olgu erken evrededir. Yüksek intratümöral CD4 yoğunluğuna sahip 9 olgu ileri evrede, 1 olgu erken evrededir.
- Düşük intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu erken evrededir. Yüksek intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu ileri evrede, 2 olgu erken evrededir.
- Yüksek intratümöral plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu erken evrede, 2 olgu ileri evrededir. Düşük intratümöral plazma hücresi/ lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 7 olgu ileri evrede, 2 olgu erken evrededir.
- Düşük intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 9 olgunun 6'sında lenfovasküler invazyon yok, 3'ünde lenfovasküler invazyon vardı. Yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 11 olgunun 2'sinde lenfovasküler invazyon yok, 9'unda lenfovasküler invazyon vardır,
- Düşük intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 9 olgunun 6'sında lenfovasküler invazyon yok, 3'ünde lenfovasküler invazyon vardı. Yüksek intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 11 olgunun 2'sinde lenfovasküler invazyon yok, 9'unda lenfovasküler invazyon vardır,
- Yüksek intratümöral plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 11 olgunun 7'sinde lenfovasküler invazyon yok, 4'ünde lenfovasküler invazyon vardı. Yüksek intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgunun 1'inde lenfovasküler invazyon yok, 8'inde lenfovasküler invazyon vardır.
- Düşük.intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 9 olgunun 5'inde perinöral invazyon yok, 4'ünde perinöral invazyon vardı. Yüksek intratümöral CD8 yoğunluğuna sahip 11 olgunun 1'inde perinöral invazyon yok, 10'unda perinöral invazyon vardır,
- 10 olgunun yaşam verisine ulaşılmış olup, düşük intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 3 olgunun hepsi sağ, yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 7 olgunun hepsi ex olmuştur. Düşük intratümöral CD4 ve CD8 yoğunluğuna sahip 4 olgunun 3'ü sağ, 1'i ex, yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 6 olgunun hepsi ex olmuştur.

Tablo 7. Safra Kesesi olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon W)

Parametre	Olg. Sayısı	İnttm Foxp3(p*)	İnttm CD8 (p*)	İnttm CD4 (p*)	İnttm (p*) Foxp3/CD4	İntTm (p*) Nötr/lenf	İntTm (p*) Plaz/lenf
Cinsiyet	6 Erkek 14 Kadın	,503	,774	1,000	,359	,503	,214
Yaş	8 düşük 8 yüksek	1,000	,333	,626	,181	1,000	1 ,000
Çap	10 düşük ç 10yüksk ç.	,661	,189	,383	,909	,661	,661
Evre	11 erken 9 ileri	,000*	,000*	,000*	,878	,000*	,009*
Grade	1 gr 1,2 gr 3	,668	,668	,542	,021*	,668	,425
Lenfvsk.inv	8 yok 12 var	,032*	,032*	,075	,391	,032*	,020*
Perinrl inv	6 yok 14 var	,214	,028*	,058	,381	,214	,503
Yaşam dur.	3 sağ 7 ex	,003*	,016*	,016*	,490	,003*	,003*
Differan.	15 iyi,orta 5 az	,023*	,206	,131	,965	,023*	,077
Prognostik	11 kötü 9 iyi	,000*	,001*	,000*	,673	,000*	,000*

- Düşük intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 3 olgunun hepsi sağ, Yüksek intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 7 olgunun hepsi extir.
- Düşük.intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 9 olgunun hepsi iyi ve orta diferansiye . Yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 11 olgunun 6'sı iyi ve orta diferansiye, 5'i az diferansiyedir..
- Düşük intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu iyi-orta diferansiyedir. Yüksek intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 11 olgunun 5'i az diferansiye, 6 olgu iyi-orta diferansiyedir.

- Düşük intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 9 olgu iyi prognozludur. Yüksek intratümöral FOXP3 yoğunluğuna sahip 11 olgu kötü prognozludur.
- Düşük intratümöral CD8 ve CD4 yoğunluğuna sahip 9 olgunun 8'i iyi tprognozludur. Yüksek intratümöral CD8 ve CD4 yoğunluğuna sahip 11 olgunun 10'u kötü prognozlu, 1'i iyi prognozludur.
- Düşük intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu iyi prognozludur. Yüksek intratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 11 olgu kötü prognozludur.
- Yüksek intratümöral plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 11 olgunun 9'u iyi, 2'si kötü prognozludur. Düşük intratümöral plazma hücresi/lenfosit oranı yoğunluğuna sahip 9 olgu kötü prognozludur.

4.4.Safra kesesi kanser olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar

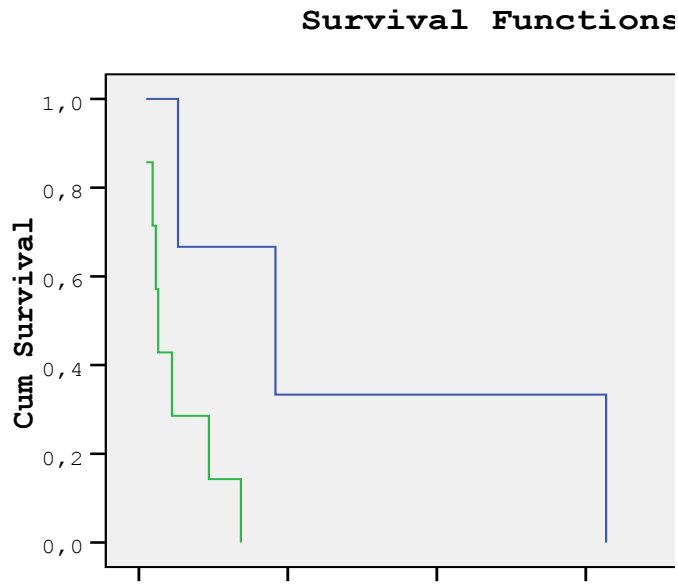
- Yaş ile tümör çapı dağılımları arasında belirgin korelasyon bulunmuştur ($p=0,001$)
- İntratümöral Foxp3 yoğunluğu dağılımı; intratümöral CD8 yoğunluğu dağılımı ($p=0,000$), intratümöral CD4 yoğunluğu dağılımı ($p=0,000$), erken-ileri evre ($p=0,000$), sağ- ex durumu ($p=0,005$), prognoz ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,023$) dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır.
- İntratümöral CD8 ve CD4 yoğunluğu dağılımı benzer görünümde olup; intratümöral Foxp3 yoğunluğu dağılımı ($p=0,000$), erken-ileri evre ($p=0,000$), sağ- ex durumu (CD8 için, $p=0,020$),(CD4 için, $p=0,013$), prognoz ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma hücresi/lenfosit oranı (CD8 için $p=0,014$, CD4 için $p=0,013$) dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır.
- İntravasküler invazyon ile sağ-ex durumu ($p=0,010$), intratümöral Foxp3 yoğunluğu ($p=0,027$), prognoz ($p=0,027$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,027$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,015$), diferansiasyon derecesi ($p=0,036$) dağılımları arasında anlamlı korelasyon izlendi.

- Prognoz ile intratümöral Foxp3 yoğunluğu ($p=0,000$), CD4 yoğunluğu ($p=0,007$), CD8 yoğunluğu ($0,000$), damar invazyonu ($0,027$), erken-ileri evre ($p=0,006$) ve sağ-ex durumu ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ve plazma hücresi/lenfosit oranı dağılımları arasında belirgin korelasyon izlenmektedir.

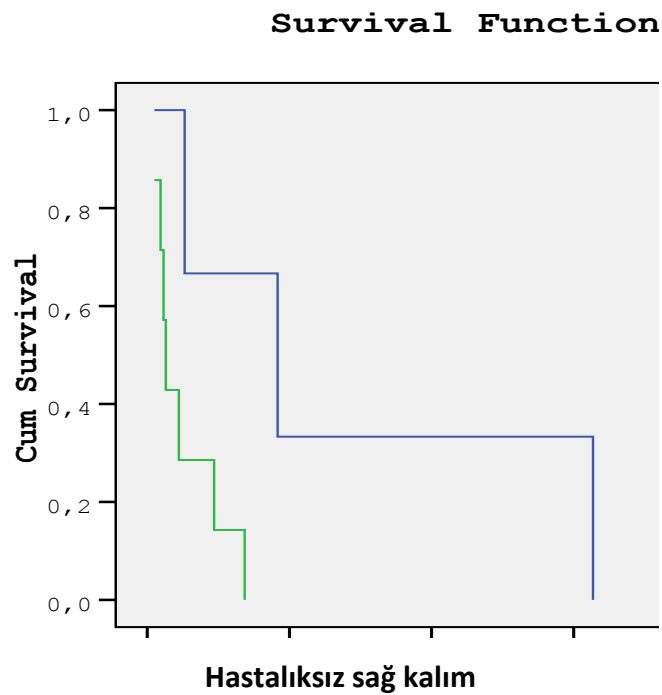
4.5.Safra kesesi kanser olgularında İntratümöral Foxp3 Prognoz ilişkisi

Safra kesesi kanser olgularının intratümöral alanlarında yüksek oranda Foxp3 yoğunluğuna sahip olan bulgularına ulaşılan 10 vakasında hastalıksız sağ kalım ortalama gün sayısı $252,00 \pm 89,433$, düşük Foxp3 oranına sahip olgularda hastalıksız sağ kalım gün sayısı ortalama $1438,667 \pm 869,413$ düzeyinde bulunmuştur ($p=0,048$). Ayrıca, intratümöral Foxp3 yoğunluğu yüksek olan 7 olgunun 7'si de prognostik olarak kötü değerlendirilmiştir. İntratümöral Foxp3 yoğunluğu düşük olan 3 olgunun 3'ü de iyi prognozlu olarak değerlendirilmiştir ($p<0.05$). Bu bulgular eşliğinde; “**Yüksek intratümöral Foxp3 miktarı kötü prognostik bir faktördür.**” Sonucuna varılmıştır (Grafik 4).

Tümöral alanlarda yüksek nötrofil/lenfosit, düşük plazma hücresi/lenfosit oranları ve yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğu arasında hastalıksız sağ kalım verileri açısından birebir mutlak korelasyon bulunmuştur. Bu durumda grafik yüksek intratümöral Foxp3'e ait grafik ile aynı görünümündedir. Bu durumda; “**yüksek nötrofil/lenfosit oranı ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranı belirgin düşük hastalıksız sağ kalım gün sayısı ile kötü prognostik bir faktördür.**” sonucuna varılmıştır.



Grafik 1. Safra kesesi kanser olgularında intratümöral Foxp3 yüksek olan olguların sağ kalım grafiği.



Grafik 2. Safra Kesesi olgularında, İnatümöral yüksek Foxp3 yoğunluğu, nötrofil yoğunluğu ve düşük plazma hücre yoğunluğu düşük hastaliksız sağ kalımla (yeşil çizgi) ve kötü prognozla ilişkilidir.

4.6.Pankreas olgularına genel bakış

Çalışmaya alınan 25 pankreatik karsinom olgusunun; 14'ü (%56) erkek, 11'i (%44) kadındı. Olguların yaş ortalaması $62,9 \pm 12,5$ (46-84) bulundu. Olguların tümör çapı ortalama $4,524 \pm 2,562$ (1,5 cm ile 12 cm arasında) ölçülmüştür. 4 (%16) olgu evre T1, 9 (%36) olgu evre T2, 12 (%48) olgu ise evre T3 olarak saptanmış olup, 2 olgu stage Ia (%8), 2 olgu stage Ib (%8), 2 olgu stage IIa (%4), 14 olgu stage IIb (%56), 6 olgu ise stage IV (%24) olarak değerlendirildi. 9 (%36) olguda perinöral invazyon görülürken, 16 (%64) olguda perinöral invazyon görülmedi. Olguların 4'ünde (%4) lenfovasküler invazyon tespit edilmişken, 21 (%84) olguda lenfovasküler invazyon görülmedi. 6 (%24) olguda çevre dokularda, metastatik lenf nodu tutulumu mevcut olmayıp, 19 (%76) olguda metastatik lenf nodları saptandı. 14 olgunun uzak metastaz bilgisine ulaşılmış olup, bunların 5'inde (%35,7) uzak metastaz görülmüş, 9'unda metastaz görülmemiştir. Bilgilerine ulaşılabilen, 5 (%22,7) olgunun sağ olduğu, 17 (%68) olgunun ise ex olduğu saptanmış olup, 3 olgunun yaşam verisine ulaşılamamıştır. Olgulara ait hastalıksız sağ kalım süreleri 15 ile 1015 gün arasında (ortalama 429,41 gün) olarak tespit edilmiştir. Stage, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, tümör lenf nodu tutulumu, metastaz durumu, yaşam-ölüm durumu bir arada değerlendirilerek elde edilen prognostik sınıflamaya göre olguların 15'i (%60) kötü prognozlu, 10'u (%40) ise iyi prognozlu olarak saptandı.

Pankreatik karsinom olgularının tümör kesitlerine uygulanan İHK inceleme sonrasında 5 büyük büyütme alanındaki pozitif boyanma gösteren T hücrelerin sayılması ile elde edilen bulgular; Peritümöral alanlarda Foxp3 pozitivitesi ortalama $80,84 \pm 40,988$ (28-220), intratümöral alanlarda ise Foxp3 sayısı ortalama $15,80 \pm 5,477$ (9-30) bulunmuştur. Peritümöral alanlarda CD8 pozitif boyanan hücre sayısı ortalama $274,40 \pm 189,711$ (95-970), intratümöral alanlarda ise $52,48 \pm 21,607$ (30-100) dır. Peritümöral alanlarda CD4 pozitif hücre sayısı ortalama $326,64 \pm 177,846$ (124-960), intratümöral alanlarda CD4 ortalama $46,00 \pm 15,438$ (30-90) dır. Diğer bir bulgu; intratümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı $33,20 \pm 4,123$ (25-40), peritümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı ise $24,68 \pm 3,262$ (19-29) bulunmuştur. Tümör alanlarında ölçülen nötrofil/lenfosit oranı ortalama % 31,40 (en düşük % 5, en yüksek % 70) dir. Benzer şekilde tümör alanlarında eş zamanlı ölçülen plazma hücresi/ lenfosit oranı ortalama % 8.08 (en düşük %1, en yüksek %25) dir (Tablo 8).

Tablo 8. Pankreatik kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları (SPSS).

Tanımlayıcı Bulgular

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yas	20	46	84	62,90	12,515
Cap	25	1,5	12,0	4,524	2,5623
Peritmfox	25	28	220	80,84	40,988
Intrtmfox	25	9	30	15,80	5,477
peritmcd8	25	95	970	274,40	189,711
Intrtmcd8	25	30	100	52,48	21,607
peritmcd4	25	124	960	326,64	177,846
Intrtmcd4	25	30	90	46,00	15,438
Intmfoxcd4	25	25	40	33,20	4,123
prtmfoxcd4	25	19	29	24,68	3,262
Metastaz	14	1	2	1,64	,497
NötLnfOr	25	5	70	31,40	22,151
PlzLnf	25	1	25	8,08	7,826
Valid N (listwise)	12				

4.7.Pankreatik kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular

Pankreatik kanser olgularının tümör kesitlerinin IHK bulgular eşliğinde incelenmesi ve paired samples statistic yöntemi ile değerlendirilen sonuçlara göre; Peritümöral alanlar ile intratümöral alanlara Foxp3 pozitivite sayısının farkı ortalama $65,04 \pm 37,203$ (18-190) bulunmuş olup, bu değer istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD4 sayıları arasındaki fark $278,92 \pm 171,291$ (92-885) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD8 sayıları arasındaki fark $221,92 \pm 179,864$ (0-890) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki Foxp3/CD4 oranlarının sayıları arasındaki fark $8,52 \pm 5,599$ (-3-18) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$), (Tablo 9).

Tablo 9. Pankreatik kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları (SPSS).

Eşli Örnek İstatistikleri

		Mean	N	Std. Deviation	P value
Pair 1	Peritmfox	80,84	25	40,988	0,000*
	İntrtmfox	15,80	25	5,477	
Pair 2	peritmcd4	326,64	25	177,846	0,000*
	intrtmcd4	46,00	25	15,438	
Pair 3	intmfoxcd4	33,20	25	4,123	0,000*
	prtmfoxcd4	24,68	25	3,262	
Pair 4	peritmcd8	274,40	25	189,711	0,000*
	intrtmcd8	52,48	25	21,607	

4.8.Pankreatik kanser olgularında intratümöral T lenfosit, nötrofil ve plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması

Cinsiyet, yaş, tümör çapı, tümör T evresi, lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, yaşam durumu, uzak metastaz, stage, diferansiasyon, prognostik durum gibi prognostik parametreler ile intratümöral Foxp3, CD8, CD4 yoğunlukları, Foxp3/CD4 oranı, intratümöral nötrofil/lenfosit oranı, intratümöral plazma hücresi /lenfosit oranı istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 7). Anlamlı sonuçlar aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir;

- İnatümöral Foxp3 yoğunluğu medyan değere göre yüksek (14 pozitif boyanma ve üstü) 12 olgunun 9'u 75 yaş altında (medyan değere göre erken yaş) 3'ü 75 yaşın üstündedir (medyan değere göre ileri yaş). İnatümöral Foxp3 yoğunluğu düşük 8 olgunun 7'si 75 yaşın altında, 1'i 75 yaşın üstündedir ($p<0,05$).
- İnatümöral Foxp3 yoğunluğu yüksek olan 14 kişinin 14'ünde yani hepsi ex olmuştur. İnatümöral Foxp3 yoğunluğu düşük olan 8 olgunun 3'ü ex, 5'i sağdır ($p<0,05$).
- İnatümöral Foxp3 yoğunluğu yüksek olan 15 olgunun 14 prognostik olarak kötü, 1'i prognostik olarak iyi olarak değerlendirilmiştir. İnatümöral Foxp3 yoğunluğu düşük olan 10 olgunun 9'u iyi, yalnızca 1'i kötü olarak değerlendirilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 10. Pankreas olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon W)

Parametre	Olg. Sayısı	İnttm Foxp3(p*)	İnttm CD8 (p*)	İnttm CD4 (p*)	İnttm (p*) Foxp3/CD4	İntTm (p*) Nötr/lenf	İntTm (p*) Plaz/lenf
Cinsiyet	14 Erkek 11 Kadın	,492	,956	,379	,379	,408	,436
Yaş	16 düşük 4 yüksek	,046*	,058	,813	,117	,392	,812
Çap	11 düşük ç. 14 yüsk ç.	,051	,112	,297	,784	,349	,636
T evre	4 T1,2 21 T3	,264	,528	,372	,710	,108	,474
Nodal tut.	6 yok 19 var	,277	,949	,609	,544	,223	,561
Lenfvs.k.inv	21 yok 4 var	,192	,552	,795	,074	,263	,263
Perinrl inv	16 yok 9 var	,477	,532	,280	,363	,210	,645
Yaşam dur.	5 sağ 17 ex	,003*	,169	,071	,306	,006*	,005*
Metastaz	9 yok 5 var	,225	,385	,314	,141	,069	,194
Stage	10 düşük 15 yüksek	,132	,578	,290	,676	,009*	,018*
Differan.	17 iyi,orta 8 az	,838	,884	,306	,075	,265	,391
Prognostik	15 kötü 10 iyi	,000*	,013*	,003	,200	,000*	,000*

- İntratümöral CD8 yoğunluğu yüksek 14 olgunun 10'unun prognozu kötü, 4'ünün prognozu iyidir. İntratümöral CD8 yoğunluğu düşük 11 olgunun 5'inin prognozu kötü, 6'sının prognozu iyidir ($p<0.05$).

- İntratümöral CD4 yoğunluğu yüksek 12 olgunun 10'unda prognoz kötü, 2'sinde prognoz iyidir. İntratümöral CD4 yoğunluğu düşük 13 olgunun 5'inin prognoz kötü, 8'inde prognoz iyidir ($p<0.05$).
- Nötrofil/lenfosit oranı yüksek olan 14 olgunun 14'ünde yani hepsinin prognozu kötü, nötrofil/lenfosit oranı düşük olan 11 olgunun 10'unun prognozu iyi, 1'inin prognozu kötüdür ($p<0.05$).
- Nötrofil/lenfosit oranı yüksek olan 14 olgunun 14'ünde yani hepsi ex olmuş, nötrofil/lenfosit oranı düşük olan 8 olgunun 3'ü ex, 8'i sağdır ($p<0.05$).
- Nötrofil/lenfosit oranı yüksek olan 14 olgunun 10'u yüksek stageli (Stage III-IV), 4'ü düşük stageli (stage I-II), nötrofil/lenfosit oranı düşük olan 11 olgunun 4'ü yüksek stageli (stage III-IV), 7'si düşük stageli (stage I-II) dir ($p<0.05$).
- Plazma hücresi/lenfosit oranı düşük olan 14 olgunun 14'ünde yani hepsinin prognozu kötü, plazma hücresi/lenfosit oranı yüksek olan 11 olgunun 10'unun prognozu iyi, 1'inin prognozu kötüdür ($p<0.05$).
- Plazma hücresi/lenfosit oranı düşük olan 14 olgunun 14'ünde yani hepsi ex olmuş, plazma hücresi/lenfosit oranı yüksek olan 8 olgunun 3'ü ex, 8'i sağdır ($p<0.05$).
- Plazma hücresi/lenfosit oranı düşük olan 14 olgunun 10'u yüksek stageli (Stage III-IV), 4'ü düşük stageli (stage I-II), plazma hücresi/lenfosit oranı yüksek olan 11 olgunun 4'ü yüksek stageli (stage III-IV), 7'si düşük stageli (stage I-II) dir ($p<0.05$).

4.9.Pankreas kanser olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar

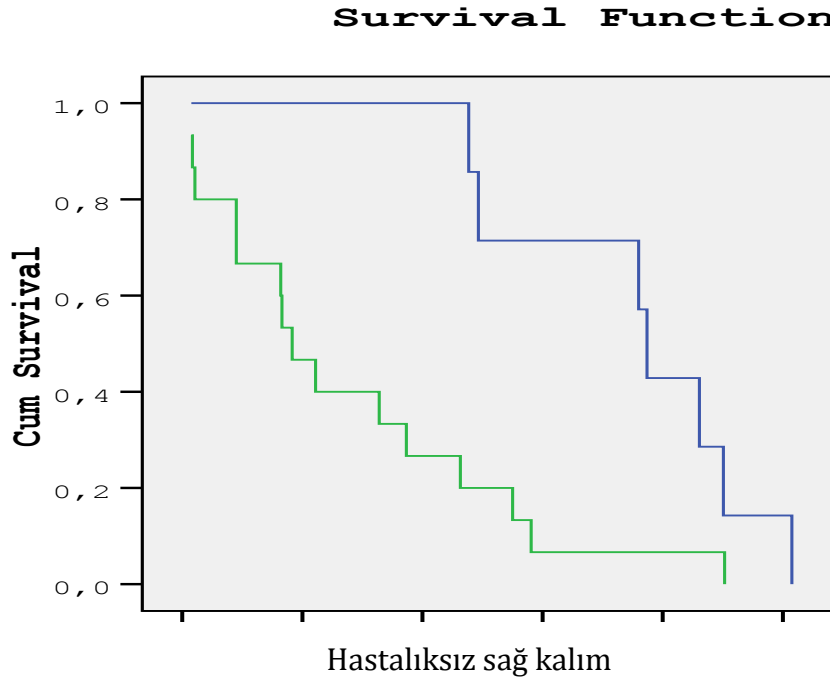
- Tümör çapı ile Tevre ($p=0,015$), metastaz ($p=0,021$), yaş ($p=0,041$) dağılımları arasında belirgin bir korelasyon vardır.
- Lenfovasküler invazyon hastalıksız sağ kalım (gün) ($p=0,019$) dağılımları arasında korelasyon mevcuttur.
- Hastalıksız sağ kalım dağılımı ile intratümöral Foxp3 yoğunluğu ($p=0,000$), iyi ve kötü prognoz dağılımı ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ox($p=0,000$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,000$), sağ-ex durumu dağılımı ($p=0,000$) arasında korelasyon izlenmektedir.

- Sağ-ex olma durumu ile intratümöral Foxp3($p=0,007$), iyi-kötü prognos tik durum dağılımı ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma hücresi/lenfosit ($p=0,000$) dağılımı arasında belirgin korelasyon izlenmiştir.
- Metastaz (var-yok) bulunan olgular ile stage ($p=0,013$) arasında korelas yon görüldü.
- Stage ile intratümöral Foxp3 ($p=0,011$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,033$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,033$)
- İnatümöral Foxp3 ile iyi-kötü prognoz dağılımı ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,000$)
- Nötrofil/lenfosit oranı yüksekliği ve plazma hücresi/lenfosit oranı düşüklüğü arasında belirgin derecede bir korelasyon tespit edilmiştir ($p=0,000$)

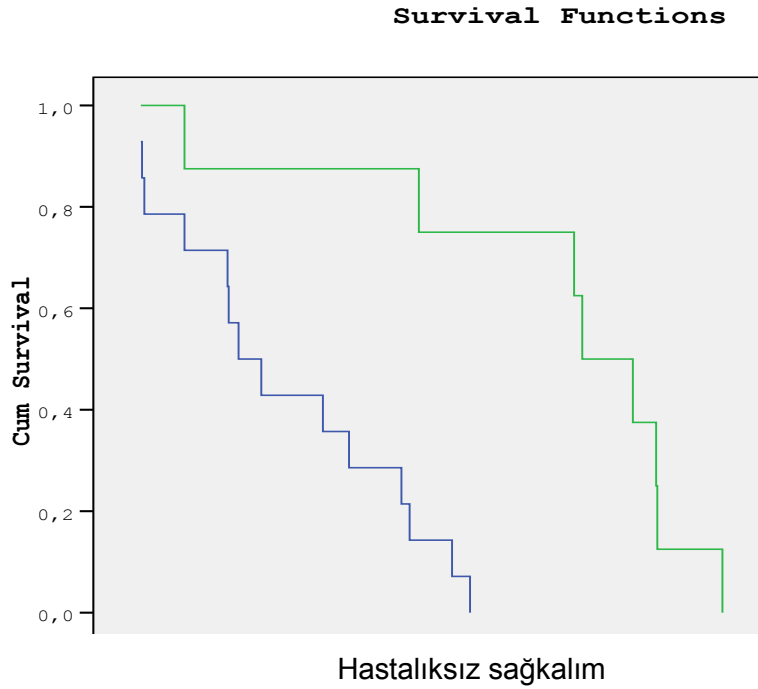
4.10.Pankreatik kanserde İnatümöral Foxp3 Prognos ilişkisi

Pankreatik kanser olgularının intratümöral alanlarında yüksek oranda Foxp3 yoğunluğuna sahip olanlarda bulgularına ulaşılan 22 vakasında hastalıksız sağ kalım ortalama gün sayısı $277,733\pm65,969$, düşük Foxp3 oranına sahip olgularda hastalıksız sağ kalım gün sayısı ortalama $754,429\pm 76,604$ düzeyinde bulunmuştur ($p=0,010$). Ayrıca, intratümöral Foxp3 yoğunluğu yüksek olan 15 olgunun 14 prognostik olarak kötü, 1'i prognostik olarak iyi olarak değerlendirilmiştir. İnatümöral Foxp3 yoğunluğu düşük olan 10 olgunun 9'u iyi, yalnızca 1'i kötü olarak değerlendirilmiştir ($p<0.05$). Bu bulgular eşliğinde; “ **Yüksek intratümöral Foxp3 miktarı kötü prognostik bir faktördür.**” Sonucuna varılmıştır (Grafik 1).

Tümöral alanlarda yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranları arasında birebir mutlak korelasyon bulunmuştur. Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranlarına ait hastalıksız sağ kalım $260,714\pm155,611$ gün, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranlarına ait hastalıksız sağ kalım ise $724,625\pm105,723$ gün olup, aralarında belirgin fark vardır ($p=0,000$). Bu durumda; “**yüksek nötrofil/lenfosit oranı ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranı belirgin düşük hastalıksız sağ kalım gün sayısı ile kötü prognostik bir faktördür.**” sonucuna varılmıştır.



Grafik 3. Yüksek intratümöral Foxp3 oranlarına sahip olguların, düşük Foxp3 oranlarına sahip olgulara göre prognozu daha kötüdür. Grafikte mavi çizgi düşük, yeşil çizgi yüksek Foxp3 oranlarına ait hastaliksız sağ kalım eğrileri olup, aralarında belirgin bir yaşam süresi farkı vardır.



Grafik 4. İntratümöral yüksek nötrofil yoğunluğu ve düşük plazma hücre yoğunluğu düşük hastaliksız sağ kalımla (mavi çizgi) ve kötü prognozla ilişkilidir.

4.11.Karaciğer kanser olgularına genel bakış

Çalışmaya alınan 8 karaciğer kanser olgusunun; 1'i (%12,5) kadın, 7'si (%87,5) erkekdi. Olguların yaş ortalaması $66,86 \pm 14,029$ (51-88) idi. Olguların tümör çapı ortalama $7,837 \pm 3,1618$ (4,2 cm ile 14 cm arasında) ölçülmüştür. 4 (%50) olgu evre T1,2, 4 (%50) olgu evre T3 olarak saptandı. Olguların 4'ünde(%50) lenfovasküler invazyon varken, 4 (%50) olguda lenfovasküler invazyon görülmedi. Olguların 5'i (%62,5) iyi diferansiye, 3'ü (%37,5) orta diferansiyedir. 5 olgu (%62,5) düşük nükleer grade'li, 3 olgu (%37,5) yüksek nükleer grade'e sahipti. 6 olgu (%75) düşük mitoz sayısına sahipken, 2 olgu (%25) yüksek mitotik orana sahipti. Bilgilerine ulaşılabilen, 3 (%50) olgunun sağ olduğu, 3 (%50) olgunun ise ex olduğu saptanmış olup, 2 olgunun yaşam verisine ulaşılamamıştır. 6 olguya ait hastalıksız sağ kalım süreleri ortalama $312,33 \pm 153,799$ gün (153 ile 593 gün arasında) olarak tespit edilmiştir. Stage, diferansiasyon lenfovasküler invazyon, yaşam-ölüm durumu hastalıksız sağ kalım gün sayısı bir arada değerlendirilerek elde edilen prognostik sınıflamaya göre olguların 4'ü (%50) kötü prognozlu, 4'ü(%50) ise iyi prognozlu olarak saptandı.

Karaciğer karsinom olgularının tümör kesitlerine uygulanan İHK inceleme sonrasında 5 büyük büyütme alanındaki pozitif boyanma gösteren T hücrelerin sayılması ile elde edilen bulgular; Peritümöral alanlarda Foxp3 pozitivitesi ortalama $49,88 \pm 18,326$ (35-86), intratümöral alanlarda ise Foxp3 sayısı ortalama $17,75 \pm 2,915$ (14-22) bulunmuştur. Peritümöral alanlarda CD8 pozitif boyanan hücre sayısı ortalama $320,63 \pm 78,473$ (205-430), intratümöral alanlarda ise $55,00 \pm 11,576$ (39-69) dır. Peritümöral alanlarda CD4 pozitif hücre sayısı ortalama $350,63 \pm 77,463$ (245-460), intratümöral alanlarda CD4 ortalama $49,75 \pm 6,882$ (40-56) dır. Diğer bir bulgu; intratümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı $35,63 \pm 2,446$ (32-39), peritümöral alanlarda Foxp3/CD4 oranı ise $14,63 \pm 5,902$ (7-27) bulunmuştur. Tümör alanlarında ölçülen nötrofil/lenfosit oranı ortalama $\% 17,13 \pm 11,038$ (en düşük $\% 7$, en yüksek $\% 27$) dir. Benzer şekilde tümör alanlarında eş zamanlı ölçülen plazma hücresi/ lenfosit oranı ortalama $\% 6,88 \pm 4,454$ (en düşük $\% 3$, en yüksek $\% 15$) dir (Tablo 10).

Tablo 11. Karaciğer kanser olgularına ait tanımlayıcı istatistik bulguları (SPSS).**Tanımlayıcı Bulgular**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yas	7	51	88	66,86	14,029
çap	8	4,2	14,0	7,837	3,1618
Intrtmfox	8	14	22	17,75	2,915
Prtmfox	8	35	86	49,88	18,326
Intrtmcd4	8	40	56	49,75	6,882
Prtmcd4	8	245	460	350,63	77,463
Intrtmcd8	8	39	69	55,00	11,576
Prtmcd8	8	205	430	320,63	78,473
Intmfoxcd4	8	32	39	35,63	2,446
Prtmfoxcd4	8	7	27	14,63	5,902
hstlkszgkl	6	153	593	312,33	153,799
NötrlenfO	8	7	40	17,13	11,038
PlazlenfO	8	3	15	6,88	4,454
Valid N (listwise)	5				

Prognostik parametrelerle karşılaştırılan ortanca değere göre sınıflanan bulgular; Yaş bulgularına ulaşılan olgular arasında olguların 4'ü (%50) 58 yaş altı, 4'ü (%50) 58 yaş üstü olarak saptandı. Tümör çapı 4 olguda (%50) 7,25 cm'nin altında, 4 olguda (%50) 7,25 cm'nin üzerindedir. İntratümöral Foxp3 yoğunluğu ortanca değer göre 3 olguda (%37,5) 18'den düşük, 5 olguda (%62,5) 18'den yüksek bulunmuştur. İntratümöral CD4 yoğunluğu 3 olguda (%37,5) medyan değer 52'nin altında, 5 olguda (%62,5) 52'nin üzerindedir. İntratümöral CD8 miktarı 4 olguda (%50) medyan değer 55'in altında, 4 olguda (%50) 55'in üzerindedir. Nötrofil/lenfosit oranı 4 olguda (%50) medyan değer 12,5'in altında, 4 (%50) olguda 12,5'in üzerindedir. Plazma hücresi/lenfosit oranı 4 olguda (%50) medyan değer 5,5'in altında, 4 (%50) olguda 5,5'in üzerindedir.

4.12. Karaciğer kanser olgularında intratümöral ve peritümöral alanlarda T hücre sayısı farklarının saptanmasına ait bulgular

Karaciğer kanser olgularının tümör kesitlerinin IHC bulgular eşliğinde incelenmesi ve paired samples statistic yöntemi ile değerlendirilen sonuçlara göre; Peritümöral alanlar ile intratümöral alanlara Foxp3 pozitivite sayısının farkı ortalama $32,125 \pm 18,696$ (47,756-16,494) bulunmuş olup, bu değer istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,002$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD4 sayıları arasındaki fark $300,875 \pm 76,712$ (236,742-365,008) olup, istatistiksel olarak önemlidir.

($p<0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki CD8 sayıları arasındaki fark $265,625\pm78,280$ (200,182-331,068) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Peritümöral ve intratümöral alanlardaki Foxp3/CD4 oranlarının sayıları arasındaki fark $21,00\pm6,459$ (15,600-26,400) olup, istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$), (Tablo 12).

Tablo 12. Karaciğer kanser olgularında intra-peritümöral T hücre farklılıkları (SPSS).

Eşli Örnek İstatistiği

		Mean	N	Std. Deviation	p value
Pair 1	Intrtmfox	17,75	8	2,915	,002
	Prtmfox	49,88	8	18,326	
Pair 2	Intrtmcd4	49,75	8	6,882	,000
	Prtmcd4	350,63	8	77,463	
Pair 3	Intrtmcd8	55,00	8	11,576	,000
	Prtmcd8	320,63	8	78,473	
Pair 4	Intmfoxcd4	35,63	8	2,446	,000
	Prtmfoxcd4	14,63	8	5,902	

Tablo 13. Karaciğer olgularında T lenfosit, nötrofil, plazma hücre sayıları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması (Mann-Whitney U, Wilcoxon)

Parametre	Olg. Sayısı	İnttm Foxp3(p^*)	İnttm CD8 (p^*)	İnttm CD4 (p^*)	İnttm (p^*) Foxp3/CD4	İntTm (p^*) Nötr/lenf	İntTm (p^*) Plaz/lenf
Cinsiyet	7 Erkek						
	1 Kadın	,197	,439	,317	,439	,317	,317
Yaş	2 58 altı	,327	,327	,180	,823	,823	,823
	5 58 üstü						
Çap	4 7,25 altı	,495	,495	,186	,495	,186	,186
	4 7,25 üstü						
T evre	4 T1,2						
	4 T3	,495	,495	,186	,495	,186	,186
Lenfvs.k.inv	4 yok						
	4 var	,040*	,495	1 ,000	,495	,008*	,008*
Nükleer Gr	5 düşük						
	3 yüksek	,112	,217	,495	,217	,040*	,040*
Yaşam dur.	3 sağ						
	3 ex	,114	1,000	,456	1,000	,025*	,025*

Mitoz	6 düşük 2 yüksek	,237	,693	1 ,000	,049*	,127	,127
Differan.	5 iyi 3 orta	,112	,217	,495	,217	,040*	,040*
Prognostik	4 kötü 4 iyi	,040*	,495	1,000	,495	,008*	,008*

4.12.1.Karaciğer kanser olgularında T hücre, Nötrofil ve Plazma hücresi yoğunluklarının prognostik parametrelerle karşılaştırılması

- İntratümöral Foxp3 yoğunluğu 18'den yüksek 5 olgunun 4'ünde lenfovasküler invazyon var, 1'inde yoktur (p=0,040). İntratümöral Foxp3 yoğunluğu düşük 3 olguda lenfovasküler invazyon yoktur (Tablo 13).
- İntratümöral nötrofil/lenfosit oranı yoğunluğu 12,5'den yüksek 4 olgunun 4'ünde de lenfovasküler invazyon vardır (p=0,008). Kalan 4 olguda lenfovasküler invazyon yoktur.
- Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olgunun 3'ünde nükleer grade yüksek, 1 olguda düşük, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olguda nükleer grade düşüktür (p=0,040).
- Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 3 olgunun 3'ünde sağ, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 3 olgunun 3'ünde extir (p=0,025).
- Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olgunun 3'ü orta diferansiye, 1'i iyi diferansiye, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olgunun 4'ünde iyi diferansiyedir (p=0,040).
- Yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 5 olgunun 4'ü prognostik olarak kötü, 1'i prognostik olarak iyi, düşük intratümöral Foxp3 yoğunluğuna sahip 3 olgunun 4'ünde prognostik olarak iyidir (p=0,040).
- Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olgunun 4'ünde prognostik olarak kötü, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranına sahip 4 olgunun 4'ünde prognostik olarak iyidir (p=0,008).

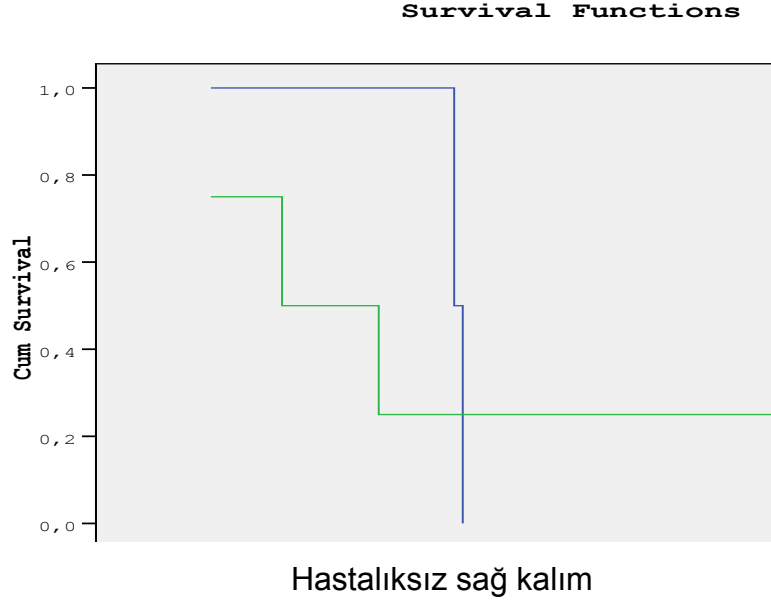
4.13.Karaciğer olgularındaki bulgular arasındaki anlamlı korelasyonlar

- Cinsiyet ile hastalıksız sağ kalım ($p=0,000$) ve sağ ex ($0,000$) olma dağılımları arasında bir korelasyon izlenmektedir.
- Diferansiasyon ile lenfovasküler invazyon ($p=0,024$), nükleer grade ($p=0,000$), mitoz ($p=0,034$), prognoz ($p=0,024$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,024$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,024$) dağılımları arasında istatistiksel olarak belirgin korelasyon izlenmektedir.
- T evre ile tümör çapı ($p=0,000$) arasında korelasyon izlendi.
- Lenfovasküler invazyon ile nükleer grade ($p=0,024$), intratümöral Foxp3 yoğunluğu ($p=0,024$), sağ-ex durumu ($p=0,000$), prognoz ($p=0,000$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma/lenfosit oranı ($p=0,000$) arasında korelasyon izlendi.
- Nükleer grade ile mitoz ($p=0,000$), prognoz ($p=0,024$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,024$), plazma/lenfosit oranı ($p=0,024$) arasında korelasyon izlendi.
- Mitoz ile hastalıksız sağ kalım gün sayıları ($p=0,016$) dağılımları arasında korelasyon izlendi.
- İntratümöral Foxp3 yoğunluğu ile lenfovasküler invazyon ($p=0,024$), prognoz ($p=0,024$), Nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,024$), plazma hücresi/lenfosit oranı ($p=0,024$) dağılımları arasında korelasyon vardır.
- Prognoz ile lenfovasküler invazyon ($p=0,024$), nükleer grade ($p=0,024$), intratümöral Foxp3 yoğunluğu ($p=0,024$), nötrofil/lenfosit oranı ($p=0,000$), plazma/lenfosit oranı ($p=0,000$) arasında korelasyon izlendi.
- İntratümöral CD4 yoğunluğu ile intratümöral CD8 yoğunluğu dağılımları arasında korelasyon vardır.
- İntratümöral Foxp3/CD4 oranı mitotik oran ($p=0,034$) arasında korelasyon vardır.

4.14.Karaciğer kanserde İntratümöral Foxp3 Prognoz ilişkisi

Karaciğer kanser olgularının intratümöral alanlarında yüksek oranda Foxp3 yoğunluğuna sahip olanlarda bulgularına ulaşılan 22 vakasında hastalıksız sağ kalım ortalama gün sayısı $305,000 \pm 98,998$, düşük Foxp3 oranına sahip olgularda hastalıksız sağ kalım gün sayısı ortalama $327,000 \pm 3,000$ düzeyinde bulunmuştur ($p=0,713$). Ayrıca, intratümöral Foxp3 yoğunluğu yüksek olan 4 olgunun 3'ü

prognostik olarak kötü, 1'i prognostik olarak iyi olarak değerlendirilmiştir. İntratümöral Foxp3 yoğunluğu düşük olan 2 olgu iyi olarak değerlendirilmiştir ($p>0.05$). Bu bulgular eşliğinde; Karaciğer olgularında “**Yüksek intratümöral Foxp3 miktarına sahip olgular daha düşük ortalama yaşam süresine sahip olmakla beraber bulgular istatistiksel olarak kötü prognoz ile ilişkili değildir.**” Sonucuna varılmıştır (Grafik 5).



Grafik 5. Karaciğer kanserinde Yüksek Foxp3 yoğunluğuna sahip olgular (yeşil çizgi) ile hastalıksız sağ kalım bulguları arasındaki yaşam tablosu

Tümöral alanlarda yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranları arasında birebir mutlak korelasyon bulunmuştur. Yüksek nötrofil/lenfosit ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranlarına ait hastalıksız sağ kalım $339,000 \pm 131,489$ gün, düşük nötrofil/lenfosit ve yüksek plazma hücresi/lenfosit oranlarına ait hastalıksız sağ kalım ise $285,667 \pm 41,370$ gün olup, aralarında belirgin fark bulunamamıştır ($p=0,832$). Bu durumda; “**yüksek nötrofil/lenfosit oranı ve düşük plazma hücresi/lenfosit oranının, hastalıksız sağ kalım gün sayısı ile ilişki bulunamamıştır.**” sonucuna varılmıştır.

5.TARTIŞMA

Regulatör T hücreler insan tümörlerinde sıklıkla bulunmaktadır. Başta malign melanom olmak üzere pek çok insan malign tümörlerinde intratümöral ve peritümöral alanlarda Foxp3+CD4 Treg hücreler sayılmış ve peritümöral alanlarla karşılaştırıldığında intratümöral alanlarda Foxp3CD4 Treg hücrelerde önemli oranda bir artış bulunmuştur. Buna ek olarak, bazı hastalar ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinden tespit edilen Foxp3CD4 Treg hücre miktarları tümör alanlarındakinden 3-5 kat daha az bulunmuştur. Bu bulgular Foxp3 ekspresyonu gösteren CD4 hücrelerin tümörlerde selektif olarak toplandığını ve onların periferik kandaki sıklıklarının tümör mikroçevresini uygun bir şekilde yansıtmadığı belirtilmiş ve tümör infiltre eden CD4 Treg hücre popülasyonunun Foxp3 ekspresyonunun gösterilmesi ile doğru olarak tanımlanabileceği gösterilmiştir. Sonuçta çalışmalar , Foxp3 ekspresyonunun, tümör mikroçevresinde insan Treg hücreler için anahtar bir biyolojik belirteç olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, metod olarak, bitişik tümör grupları ve tek tek tümör hücreleri arasındaki IHC olarak pozitif Foxp3, CD4 ve CD8 hücreleri intratümöral, tümör çevresi yakın stromal dokulardaki pozitif hücreler ise peritümöral olarak değerlendirilmiştir (102). Gastrik kanser olgularında intra tümöral Foxp3 yoğunluğunu araştıran başka bir çalışmada, Foxp3 pozitif Treglerin medyan sayısına göre intra tümöral alanlarda, otolog normal dokulara göre önemli oranda daha yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (103). Kolorektal karsinom, hepatosellüler karsinom, meme ve pankreasa ait kanser olgularıyla yapılan benzer çalışmalar, bu olguların periferik kanında, kontrol sağlıklı bireylerin periferik kanına göre yüksek Foxp3 miktarlarına sahip olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmalarda, intratümöral alanlarda ve otolog normal dokulardakine göre yüksek Foxp3 miktarları saptanmıştır (104,105,106). Biz çalışmamızda, intratümöral ve peritümöral alanlar, metodolojik olarak, Metastatik Melanom çalışmasında olduğu gibi değerlendirilmiş olup, Safra Kesesi, Pankreas, Karaciğer kanser olgularında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Safra kesesi kanser olgularına ait peritümöral alanlarda, intratümöral alanlara göre pozitif boyanma sayısı, Foxp3 ile 4,9 kat ($p=0,000$), CD8 ile 4,6 kat ($p=0,000$), CD4 ile 5,9 kat ($p=0,000$) fazladır. Pankreas kanser olgularına ait peritümöral alanlarda, intratümöral alanlara göre pozitif boyanma sayısı, Foxp3 ile 5,1 kat ($p=0,000$), CD8 ile 5,2 kat ($p=0,000$), CD4 ile 7,1 kat ($p=0,000$) fazladır. Karaciğer kanser olgularına ait peritümöral alanlarda, intratümöral alanlara göre pozitif

boyanma sayısı, Foxp3 ile 2,8 kat ($p=0,000$), CD8 ile 5,8 kat ($p=0,000$), CD4 ile 7 kat ($p=0,000$) fazladır.

Metastatik Melanom çalışmasında, Foxp3 pozitif hücrelerinin selektif toplanmasının bir kriteri olarak, Foxp3+/CD4+ hücre miktarı oranı kullanılmıştır (102). Bu oran; intratümöral alanlarda, peritümöral alanlara göre 1,5 kat fazla bulunmuştur. Çalışmamızda bu oran; Safra Kesesi kanser olgularında, intratümöral alanlarda, peritümöral alanlara göre 1,2 kat daha fazla, Pankreas kanser olgularında intratümöral alanlarda, peritümöral alanlara göre 1,3 kat daha fazla, Karaciğer kanser olgularında intratümöral alanlarda, peritümöral alanlara göre 2,4 kat daha fazla bulunmuştur. Burada dikkat çekici bulgu, cerrahi rezeksiyon sonrasında herhangi bir ek tedavi almamış olgularda intratümöral Foxp3+, CD4+, CD8+ hücre sayılarının, peritümöral alanlara göre daha düşük olmasıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bulguya göre, intratümöral alanlarda Foxp3+/CD4+ hücre oranı peritümöral alanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buradaki bulgular, metastatik Melanom çalışması ile uyumluluk göstermektedir. İntratümöral alanlarda, peritümöral alanlara göre CD4+ ve CD8+ hücrelerin daha düşük olması ile Foxp3+/CD4+ hücre sayılarının oransal olarak intratümöral alanlarda yüksek olması Treg hücrelerin immün baskılayıcı özelliğini destekler niteliktedir.

Gastrik kanser olguları üzerine yapılan çalışmada, intratümöral alanlardaki Foxp3 pozitivite sayılarının medyan değere göre yüksek olanlarının, tümör vasküler/lenfatik/perinöral invazyon prognostik parametrelerini gösteren olgular ile istatistiksel olarak önemli oranda ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (103). Karaciğer ve Meme kanser olguları üzerine yapılan 2 çalışmada daha yüksek İntratümöral Foxp3 pozitivitesi ve vasküler invazyon arasında ilişki gözlenmiştir (105,107) Prostat kanser olguları üzerine yapılan bir araştırmada, prognostik parametreler içerisinde sadece ileri tümör evresi ve yüksek Ki67 indeksi ile yüksek intratümöral Foxp3 yoğunluğu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (108). Bir çalışmada, Hepatosellüler karsinom (HCC) olgularında, İntratümöral Treg'ler ileri stage HCC'da erken stage HCC olgularına göre daha yüksek bulunmuştur (109). Başka bir HCC çalışmasında, yüksek oranda portal ven tümör trombüsü bulunan olguların daha yüksek intratümöral Treg miktarlarına sahip olduğu bulunmuştur (110). Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma'da ektranodal tutulum gösteren olguların daha yüksek intratümöral Treg dansitesine sahip olduğu belirlenmiştir (111). Gastrik kanser olgularında yapılan başka bir çalışmada, yüksek intratümöral Foxp3 miktarları ile lenf nodu metastazi

ilişkili bulunmuştur. Aynı çalışmada, Foxp3 ekspresyonu ile tümör tipi, grade, tümör çapı, ER, PR ve HER-2 durumu ile korelasyon bulunamamıştır (112). Berrak Hücreli Renal Karsinom olgularında, peritümöral alandaki Treg yoğunluğu TNM2ye göre stage ve tümör çapı ile ilişkili bulunmuştur (113). Meme kanseri'nin bir çalışmasında, CD4+ T hücreler III. ve IV. Stage olgularda, II. Stage olgulara göre daha yüksek yoğunlukta bulunmuştur (114). Familyal Ovaryan kanser olgularında CD3+ T hücreler ve Foxp3 Treg hücreler yüksek yoğunlukları ile yüksek tümör grade'i arasında korelasyon izlenmektedir (115). Bizim çalışmamızda; İleri evre Safra Kesesi kanser olgularında erken evredekilere göre daha yüksek CD4+, CD8+ ve Foxp3+ hücre miktarları izlenmiştir ($p=0,000, p=0,000, p=0,000$). Bu olgularda, yüksek Foxp3 pozitivitesi ile az diferansiye tümörler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($p=0,023$). Yüksek Foxp3 ve CD8 pozitivitesi ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında belirgin bir ilişki görüldü ($p=0,032, p=0,032$). Ayrıca CD8 pozitivitesi ile perinöral invazyon varlığı arasında anlamlı bir ilişki izlenmektedir ($p=0,028$). Safra Kesesi kanser olgularında, cinsiyet, yaş, çap ve tümör grade'i ile T hücre yoğunluğu arasında ilişki gözlenmemiştir. Pankreas kanser olgularında, yüksek intratümöral Foxp3 pozitivitesi 75 yaş üzeri olgularda daha yüksek oranda izlenmiştir ($p=0,046$). Bu olgularda, cinsiyet, çap, T evre, nodal tümör tutulumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, metastaz ve diferansiasyon derecesi ile T lenfosit yoğunlukları arasında ilişki saptanmamıştır. Karaciğer kanser olgularında, intratümöral Foxp3 yüksekliği ile lenfovasküler invazyon varlığı arasında belirgin bir ilişki izlenmektedir ($p=0,040$). Bu olgularda, cinsiyet, yaş, tümör çapı, T evre, nükleer grade, mitotik oran ve diferansiasyon derecesi ile T hücre yoğunlukları arasında ilişki izlenmemiştir.

Metastatik Melanom, Gastrik Kanser, Kolorektal Karsinom, Hepatosellüler Karsinom, Prostatik Adenokarsinom, Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, Berrak Hücreli Renal Karsinom üzerine yapılan pek çok çalışmada, intratümöral yüksek Treg hücre pozitivitesi ile kötü prognoz ve düşük genel sağ kalım oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu ve Treg'lerin kötü prognostik bir faktör olduğu vurgulanmıştır (102, 103, 104, 105, 108, 109, 111, 112, 113) Çalışmamızda; Safra Kesesi kanser olgularında, yüksek intratümöral Foxp3, CD4 ve CD8 pozitivitesine sahip olguların hemen hemen tamamının ex oldukları saptanmıştır ($p=0,000, p=0,016, p=0,016$). Sağ-ex durumu, prognostik klinikopatolojik parametreler ve hatalıksız sağ kalım oranları dikkate alınarak prognozu kötü olarak sınıflanan

olguların yüksek intratümöral Foxp3, CD4, CD8 pozitivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir ($p=0,000$, $p=0,001$, $p=0,000$). Ayrıca yüksek Foxp3 pozitivitesine sahip olguların, düşük Foxp3 pozitivitesine sahip olgulara göre daha düşük hastalıksız sağ kalım gün sayısına sahip olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) Bu durumda, Safra Kesesi Kanseri olgularında, intratümöral Foxp3 yüksekliğinin kötü prognostik bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır.

Pankreas kanser olgularında, yüksek intratümöral Foxp3 pozitivitesine sahip olguların hemen hemen tamamının ex oldukları saptanmıştır ($p=0,003$). Sağ-ex durumu, prognostik klinikopatolojik parametreler ve hatalıksız sağ kalım oranları dikkate alınarak prognozu kötü olarak sınıflanan olguların yüksek intratümöral Foxp3, CD4, CD8 pozitivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir ($p=0,000$, $p=0,013$, $p=0,003$). Ayrıca yüksek Foxp3 pozitivitesine sahip olguların, düşük Foxp3 pozitivitesine sahip olgulara göre daha düşük hastalıksız sağ kalım gün sayısına sahip olduğu bulunmuştur ($p<0,05$) Bu durumda, Pankreatik kanser olgularında, intratümöral Foxp3 yüksekliğinin kötü prognostik bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır.

Karaciğer kanser olgularında, yüksek intratümöral Foxp3 pozitivitesine sahip olgularla yaşam durumu arasında ilişki bulunamamıştır. Sağ-ex durumu, prognostik klinikopatolojik parametreler ve hatalıksız sağ kalım oranları dikkate alınarak prognozu kötü olarak sınıflanan olguların yüksek intratümöral Foxp3 pozitivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir ($p=0,040$). Ayrıca yüksek Foxp3 pozitivitesine sahip olguların, düşük Foxp3 pozitivitesine sahip olgulara göre daha düşük hastalıksız sağ kalım gün sayısına sahip olduğu bulunmuş, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,05$) Bu durumda, yüksek intratümöral Foxp3 miktarına sahip olgular daha düşük ortalama yaşam süresine sahip olmakla beraber bulgular istatistiksel olarak kötü prognoz ile ilişkili değildir.” sonucuna varılmıştır.

Renal hücreli karsinom, melanom, kolorektal Karsinom, HCC, kolanjiokarsinom, glioblastom, GIST, gastrik, özofageal, akciğer, overan, baş ve boyun olmak üzere pek çok insan kanserlerinde tümör infiltre eden nötrofiller, yükselmiş kan nötrofilleri ve kan nötrofil/lenfosit oranının prognostik rolünün zayıf klinik gidiş ile ilişkilendirilmiş olduğu saptanmıştır (116). Melanom olgularında yapılan immün hücreleri tespit etmeye yönelik çalışmada dendritik hücreler, B hücreler ve aktive T hücrelerin belirgin infiltrasyonunun malign melanom olgularında olumlu bir prognostik faktör olabileceğini düşünmektedirler (117). Biz de çalışmamızda, intratümöral alanlarda ve yakın stromal çevrede, nötrofil yoğunluğu ile plazma hücreleri arasında negatif bir

tam korelasyon olduğunu saptadık. Yani bir olguda, tümör infiltre eden nötrofiller arttıkça, aynı olguda tümör içi plazma hücrelerinin azaldığını, azaldıkça ise tümör içi plazma hücrelerinde artış olduğunu gördük. Bu sonuçları bulgular ile karşılaştırdığımızda; Safra kesesi olgularında, yüksek nötrofil, düşük plazma hücresi yoğunluğunun ileri evre, lenfovasküler invazyon varlığı ve az diferansiye olgularda daha belirgin olduğu görüldü ($p<0,05$). Tümöral yüksek nötrofil ve düşük plazma hücre infiltrasyonu gösteren olgular büyük oranda exitus olmuş olup, prognoz olarak kötü prognoz ile ilişkili oldukları bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca bu olguların hastalıksız sağ kalım gün sayıları da belirgin olarak daha düşüktür ($p<0,05$). Pankreas kanser olgularında, yüksek nötrofil, düşük plazma hücresi yoğunluğunun yüksek stageli olgularda daha belirgin olduğu görüldü ($p<0,05$). Tümöral yüksek nötrofil ve düşük plazma hücre infiltrasyonu gösteren olgular büyük oranda exitus olmuş olup, prognoz olarak kötü prognoz ile ilişkili oldukları bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca bu olguların hastalıksız sağ kalım gün sayıları da belirgin olarak daha düşüktür ($p<0,05$). Karaciğer kanser olgularında, yüksek nötrofil, düşük plazma hücresi yoğunluğunun lenfovasküler invazyon bulunan, nükleer grade'i yüksek ve az diferansiye olgularda daha belirgin olduğu görüldü ($p<0,05$). Tümöral yüksek nötrofil ve düşük plazma hücre infiltrasyonu gösteren olgular büyük oranda exitus olmuş olup, prognoz olarak kötü prognoz ile ilişkili oldukları bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca bu olguların hastalıksız sağ kalım gün sayıları da daha düşük olmakla beraber istatistiksel olarak ilişkili bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tümör mikroçevresinde bulunan, CD4 Treg hücreler Ovaryan kanserli hastalarda gösterildiği gibi tümörler ve tümörü infiltre eden makrofajlar ile üretilen CCL22 için kemokin reseptörü CCR4 ekspresse olabilir. CCR4'ün veya diğer kemokin reseptörlerin ekspresyonunun, Melanom tümör alanlarında insan CD4 Treg hücrelerin trafiğinde bir rol oynayıp oynamadığı henüz çözüm aşamasındadır. Ek olarak, immünsüpresif tümör mikroçevresi hayvan modellerinde gösterildiği gibi tümör içinde etkilenmiş CD4 Treg hücrelerin artışını ilerletebilir (116,117). Örnek olarak, Melanom hücrelerince üretilmiş Transforming Growth Factor β (TGF- β) invitro periferik kan CD4 Treg hücreler için gösterildiği gibi tümörler içinde CD4 Treg hücrelerin toplanmasına neden olabilir (118). Daha fazlası, TGF- β farede Treg hücreleri nonregulatör CD4 T hücrelere dönüşümü geniş olarak tanımlanmıştır. Bütününüyle, tümörde insan CD4 Treg toplanmasının altında yatan mekanizma, muhtemelen intratümöral Foxp3+CD4 Treg hücrelerin artmış oranı, tümör infiltre

eden efektör T hücrelerin sitolitik fonksiyonu inhibe eder ve antitümör immün yanıtların da inhibisyonuna neden olur.

İlerlemiş stage kanserli olgularda, Tümör infiltre eden lenfositler (TIL) ve daha az oranda periferik kan lenfositlerinin zayıf bir immün yanıtı sahip olduğu iyi bilinmektedir (119). Bu tümör nedenli immünsüpresyon, hafıza antijenlerine eksilmiş yanıtlar, azalmış proliferatif T hücre yanıtları, sitokin üretimi kaybı ve T hücre ve Natural Killer hücrelerde defektif sinyal iletimini içerir. Treg'ler CD4 ve CD25'in koekspresyonuyla karakterize olmuşlardır. Treg'lerin, T hücrelerin fonksiyonel olarak eşsiz bir popülasyonu olduğu ve immün homeostazın sürdürülmesinde görev aldığı düşünülür. Treg'lerin allograft reddi, graft-versus host hastalığı ve otoimmün hastalığı engellemesinde önemli bir rol oynamasının rapor edilmiş olması sebebiyle, Treg'ler CD4+/CD25- ve CD8 T hücreler tarafından oluşturulan immün yanıtı inhibe edebilir. Kanserli olgular ve deneysel modeller Treg'lerin kanserden etkilenen kişilerde T hücre disfonksiyonu ile sonuçlanan, tümörlere karşı efektör fonksiyonun aktivitesini azaltmış olduğu görülmüştür. Bulgular, Treg'lerin artmış popülasyonunun, kanserin immünoterapisinde çözülmesi gereken ek bir problem oluşturabileceğini destekler niteliktedir. Treg regulasyonu veya Treg'lerin kontrol edilebilmesi yani azaltılabilmesi için geliştirilecek stratejilerin altında yatan mekanizmanın daha iyi anlaşılması ile, kanser için daha etkili bir immünoterapinin sağlanabileceği düşünülmektedir. Kanser aşılması veya adoptif T hücre transferini içeren kanser için immünoterapi, tespit edilmiş tümörlerin regresyonunda etkileri sınırlı olan denemeleri içermektedir. İn vivo Treg hücrelerin selektif baskılanması için çok sayıda klinik yaklaşım ortaya konmuştur (102). Bu yaklaşımlardan bazıları, lenfodeplezyon sonrası CD25 baskılanmış T hücrelerin adoptif transferi, IL-2R'ye yönelmiş sitotoksik sitotoksikler (denilokin diflitox) ve CD25'e yönelmiş immünotoksiklerin verilmesini içerir. Bir klinik denemede Metastatik Melanom'lu hastalara bir CD25'e yönelmiş immünotoksik LMB-2'nin verilmesi sirkülasyon ve intratümöral CD4 Treg hücrelerin her ikisinde de geçici parsiyel bir azalma oluşturmuştur. Bununla birlikte bu ve diğer denemelerin objektif kanser regresyonuna neden olma yeteneği, hepsinde aynı derecede umut kırıcı olmuştur ve daha fazla araştırma ve optimizasyon gerektirir. Treg hücrelerin azaltılmasına alternatif bir yaklaşım bir mürin tümör modelinde yeni gösterildiği gibi Treg hücre baskılanmasının inhibisyonuna yol açabilen OX40 gibi bağlantılı kostimülatör moleküller ile onların inhibisyonudur. Yeni bir çalışmada, interferon α

birkaç pankreatik kanser modelinde doğrudan kanser hücre ölümünün oluşumu ve immün yanıtın artırılmasını içeren multiple antitümör mekanizmalar ile kanser hücrelerine saldırabilir. Benzer bir pankreatik kanser modelinde, Treglerin fonksiyonunu baskıladığı rapor edilmiş olan agonistik anti-glukokortikoid etkili TNF reseptör (GITR) monoklonal antikör (mAb) intraperitoneal olarak verilmiş ve subkutanöz tümör büyümesini önemli oranda inhibe ettiği söylenmiştir. Bu iki yöntemin kombinasyonunu içeren yaklaşımın ümit verici bir terapötik strateji olabileceği sonucuna varılmıştır (120).

Çalışmamızı oluşturan Safra Kesesi, Pankreas, Karaciğer kanser olgularında, Foxp3+ CD4 hücrelerin oluşturduğu Treg hücreler, CD4 T hücreler, Sitotoksik CD8+ T hücreler, nötrofiller ve B hücre kökenli plazma hücrelerinin intratümöral ve peritümöral dağılımlarının daha önce büyük oranda başka kanserler üzerine yapılmış olan çalışmalar ile uyumluluk gösterdiği sonucuna vardık. Bulgular, Treg hücrelerin intratümöral alanlarda selektif olarak toplanmasının tümöre karşı oluşan CD25-CD4 T hücreler ve sitotoksik T hücrelerin oluşturacağı immün yanıtları baskıladığını ispatlar niteliktedir. Sonuçlar, immünsupresyon zemininde Treg'leri içermeyen TIL adoptif transferini içeren daha uygun kombine immünoterapötik yaklaşımlar için çalışmaların devam etmesi gerekliliğini desteklemektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Lichtman AH: Immunologic tolerance, Cellular and Molecular Immunology, stratif fifth edition, Philadelphia, Elsevier Sounders, 2005; 216-241
2. Steinmann L.: A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med. 2007; 13:139-45 Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. J Allergy Clin Immunol, 2008; 122:700-709
3. Larche M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. Curr Opin Immunol, 2006; 18:745-750
4. McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. J Exp Med, 2008; 205:2575-2584
5. Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. Allergy, 2009; 64:505-19
6. Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, Chung Y ve ark. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. J Immunol, 2009; 182:4516-4520
7. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. Immunology, 2008; 123:40-44
8. Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. Trends Mol Med, 2008; 14:550-559
9. Ozer H, Han T, Henderson ES, Nussbaum A, Sheedy D. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. J Clin Invest, 1981; 67:779-789
10. Rosenblatt J, Avigan D. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol, 2008; 21:559-577
11. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR et al.: Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity. 2006; 24:677-88
12. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. Clin Dev Immunol, 2007; 2007:89195

13. Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity-observations in mice and men. *Immunology*, 2008; 123:157–163
14. San Miguel JF, Gracia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005; 18:569–583
15. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA ve ark. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9:231.
16. Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM ve ark. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine matured DCs in myeloma patients. *Blood*, 2006; 108:2655–2661
17. Mottet C, Golshayan D. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*, 2007; 137:625–634
18. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299:1057-1061
19. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2006; 80:458-470
20. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 2007; 317:627-629
21. Qin FX. Dynamic Behavior and Function of Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Tumor Bearing Host. *Cell Mol Immunol*, 2009; 6:3-13
22. Schreiber TH. The use of Foxp3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007; 16:1931-1934
23. Popmihajlov Z, Smith KA. Negative Feedback Regulation of T cells via Interleukin-2 and FOXP3 Reciprocity. *Plos One*, 2008; 3:e1581
24. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H ve ark. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance.

25. Wang R, Wan Q, Kozhava L, Fujji H ve ark. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *Plos One*, 2008; 3:e2705
26. Ormandy IA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP ve ark. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:2457–2464
27. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early stage non-small cell lung cancer and late stage ovarian cancer. *Cancer*, 2001; 61:4766–4772
28. Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*, 2002; 168:4272–4276
29. Wei S, Kryczek I, Zou L, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:5020–5026
30. Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, Frey DM ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor specific immune response in pancreas cancer bearing mice. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13:1252–1258
31. Heier I, Hofgaard PO, Brandtzaeg P, Jahnsen FL ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*, 2008; 152:381–387
32. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL ve ark. Enhanced Functionality of CD4+CD25high FOXP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008; 14:1032–1040
33. Frierson H. Gallbladder and extrahepatic biliarry system. In Sternberg S (ed): *Hystology for Pathologists*, ed 2. Philedelphia, 1997, Lippincott-Raven Publishers, pp593-612
34. Green FHY, Fox H. An İmmunofleurosent Study of the distribution of immunoglobulin-containing cells in the normaland the inflamed human gallbladder. *Gut* 1972, 13 : 379-384

35. Felipe A. Castro, Jill Koshiol, Ann W. Hsing, Susan S. Devesa, Biliary tract cancer incidence in the United States demographic and temporal variations, *International Journal of Cancer*, 2013 Mar 18. doi: 10.1002/ijc.28161
36. Wistuba II, Gazdar AF. Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 695–706.
37. Usha Dutta, Gallbladder cancer: Can newer insights improve the outcome? *J Gastro enterol Hepatol* 2012 Apr;27(4):642-53. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07048.x,
38. Masaru Konishi, Adjuvant chemotherapy for resectable biliary tract cancer: current status and future direction, *J Hepatobiliary Pancreat Sci* (2012) 19:301–305
39. Goldin RD, Roa JC. Gallbladder cancer: a morphological and molecular update. *Histopathology* 2009; 55: 218–29.
40. Lai CH, Lau WY. Gallbladder cancer—a comprehensive review. *Surgeon* 2008; 6: 101–10.
41. Miller G, Jarnagin WR. Gallbladder carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2008; 34: 306–12.
42. Hruban RH et al.: Tumors of the pancreas. Atlas of tumor pathology. Fourth series, Fascicle 6 ed. Washington, DC, American Registry of Pathology and armed forces institute of Pathology, 2007
43. [10.http://www.medscape.com/viewarticle/442814_3](http://www.medscape.com/viewarticle/442814_3) (24.01.2010).
44. Bardeesy, N and DePinho RA, Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(12): p. 897-909
45. [Http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/digestion/pancreas/index.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/digestion/pancreas/index.html) (24.01.2010).
46. Korolija M, Hadzija MP, Hadzija M, Molecular mechanism in β -cell development: the role of Pdx1, Ngn3 and Pax4 proteins. *Periodicum Biologorum*, 2009, 111 (1): 59-63
47. American Cancer Society: Cancer Facts & Figures. Cancer 1-68, 2008, Newyork American Cancer Society.

48. Hruban RT et al.: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions, Am J Surg Pathol 25: 579,2001
49. Van Heek et al.: Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol, 2002 Nov;161(5):1541-7.
50. Bardeesy N, DePinho RA: Pancreatic Cancer Biology and Genetics. Nat Rev cancer 2: 897, 2002.
51. Jones S et al.: Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global analyses. Science 321: 1801, 2008
52. Caldas C et al.: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. Nat Genet 8, 27, 1994
53. Hahn SA et al.:DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science 271:350, 1996
54. Berman DM et al.: Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. Nature 425: 846, 2003
55. Gold EB: Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. Surg Clin North Am 75: 819, 1995
56. Rebours V et.al.: Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. Am J Gastroenterol 103:111, 2008
57. Foulkes WD: Inherited susceptibility to common cancers, N Engl J Med 359: 2143,2008
58. Gudjonsson B. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery . Cancer 1987, 60: 2284-2303
59. Pollard HM et al.: Staging of cancer of the pancreas. Cancer 1981, 47: 1631-1637
60. Rugge M et al.:Nuclear DNA content and pathology in radically treated pancreatic carcinoma: The prognostic significance of DNA ploidy, histology and nuclear grade. Cancer 1996, 77: 459-466.
61. Matthew M. Rochefort et al.: Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel TNMG Staging System, August 2013

62. Nix GA et al.: Prognostic implications of tumor diameter in carcinoma of the head of the pancreas. *Cancer* 1991, 67: 529-535.
63. Luttges J et al.: The retroperitoneal resection margin and vessel involvement and important factors determining survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Virchows Arch* 1998, 433: 237-242
64. Coppola D et al.: Analysis of p53, p21 and TGF β 1 in human ductal adenocarcinoma of the pancreas. TGF- β 1 protein expression predicts longer survival. *Am J Clin Pathol* 1998 110: 16-23
65. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):133–4.
66. MK, Davila JA, Shaib YH. Incidence and survival of pancreatic head and body and tail cancers a population-based study in the United States. *Pancreas* 2010;39:458–62.
67. Lim JE, Chien MW, Earle CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg* 2003;237:74–85.
68. Kalaitzakis E, Azam F. Adjuvant chemotherapy should be used as the standard of care for resectable pancreatic cancer. *Cancer Therapy* 2009;7:227–33.
69. Chang DK, Johns AL, Merrett ND, Gill AJ, Colvin EK, Scarlett CJ, et al. Margin clearance and outcome in resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(17): 2855–62.
70. Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg* 2006;10(4):511–8.
71. European age-standardised rates calculated by the Statistical Information Team at Cancer Research UK, 2011 using data from GLOBOCAN 2008 v1.2, IARC, version 1.2. <<http://globocan.iarc.fr>>.
72. Pawlik TM, Gleisner AL, Cameron JL, Winter JM, Assumpcao L, Lillemoe KD, et al. Prognostic relevance of lymph node ratio following pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Surgery* 2007;141(5):610–8.

73. Butturini G, Stocken DD, Wente MN, Jeekel H, Klinkenbijl JH, Bakkevold KE, et al. Pancreatic cancer meta-analysis group. Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg* 2008;143(1):75–83.
74. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006;12:5423–34)
75. Bilimoria KY, Talamonti MS, Sener SF, Bilimoria MM, Stewart AK, Winchester DP, et al. Effect of hospital volume on margin status after pancreaticoduodenectomy for cancer. *J Am Coll Surg* 2008;207(4):510–9).
76. Joseph B, Morton JM, Hernandez-Boussard T, Rubinfeld I, Faraj C, Velanovich V. Relationship between hospital volume, system clinical resources, and mortality in pancreatic resection. *J Am Coll Surg* 2009;208(4):520–7.
77. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA, et al. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:319–25
78. Arnold SA, Rivera LB, Miller AF, Carbon JG, Dineen SP, Xie Y, et al. Lack of host SPARC enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma. *Dis Model Mech* 2010;3:57–72
79. Toshio K, Takao I, Atshushi S et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: A preliminary result *J. Hepatobiliary Pancr Surg.* 2008;15:189-195
80. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;28:e26–3
81. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006;12:5423–34)
82. Neoptolemos J. P., Greenhalf W., Ghaneh P, et al. HENT1 tumor levels to predict survival of pancreatic ductal adenocarcinoma patients who received adjuvant

gemcitabine and adjuvant 5FU on the ESPAC trials. J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 4006)

83. Parkin DM et al.: Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55-74, 2005
84. Levrero M: Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. Oncogene 25:3834, 2006.
85. Khare S, Zhang Q, Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA. 19(33):5439-45, 2013
86. Lee JS et al: A novel prognostic subtype of hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. Nat. Med. 12: 410, 2006
87. Carriaga MT, Henson DE Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. Cancer, 1995 Jan 1;75(1 Suppl):171-90.
88. Kaczynski J, Hansson G, Remotti H, Wallerstedt S. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma. Histopathology, 32(2):147-50. 1998
89. Ikeda K et al. Risk factors for tumour recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. Cancer, 71: 19-25, 1993
90. Yamamoto J et al: Should hepatomas be treated with hepatic resection or transplantation? Cancer , 1151-1158, 1999.
91. Colleoni M et al: Prognostic factors in patients affected by hepatocellular carcinoma treated with systemic chemotherapy. Ann Oncol, 4: 489-493, 1993
92. Higushi T et al: Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization. A histopathologic study of 84 resected cases. Cancer 73, 2259-2267, 1994
93. Stuart KE, Anand AJ, Jenkins RL. Hepatocellular carcinoma in the United States. Prognostic features, treatment outcome, and survival. 1;77(11):2217-22, 1996
94. Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, Wu ZQ, Fan J, Qin LX, Zheng BH. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. Cancer 15;91(8):1479-86.
95. Ng IO, Lai EC, Ng MM, Fan ST. Tumor encapsulation in hepatocellular carcinoma. A pathologic study of 189 cases. 1;70(1):45-9, 1992

96. Lise M, Bacchetti S, Da Pian P, Nitti D, Pilati PL, Pigato P. Prognostic factors affecting long term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma: results in a series of 100 Italian patients. *Cancer* 15;82(6):1028-36.1998.
97. The Liver Cancer Study Group of Japan. Predictive factors for long term prognosis after partial hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* 15;74(10):2772-80.
98. Arii S et al: Predictive factors for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Cancer* 69: 913-919, 1992.
99. Lauwers GY et al: Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinomas: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index.*Am J Surg Pathol*, Jan;26(1):25-34, 2002.
100. Nzeako UC, Goodman ZD, Ishak KG, Hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic livers. A clinico-histopathologic study of 804 North American patients. *Am J Clin Pathol*, Jan;105(1):65-75, 1996
101. Ng IO et al: Better survival in female patients with hepatocellular carcinoma. Possible causes from a pathologic approach. *Cancer*, 1;75(1):18-22, 1995
102. Abou-Elella A, Gramlich T, Fritsch C, Gansler T. c-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mod Pathol*, Feb;9(2):95-8.1996
103. Mojgan Ahmadzadeh, Aloisio Felipe-Silva, Bianca Heemskerk, Daniel J. Powell, Jr, John R. Wunderlich, Maria J. Merino and Steven A. Rosenberg, FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions, *Blood* 2008 112: 4953-4960
104. Giuseppe Perrone et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer, *European Journal of cancer*, 44; 1875-82, 2008

- 105.Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun* 2007;7:7.

- 106.Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007 ;25:2586-93

- 107.Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumormicroenvironment of patients with pancreas or breastadenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756–61.

- 108.Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK. Intratumoral FOXP3 expression infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* 2007;46:792–7.

- 109.Flammier A et al. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1273-9.

- 110.Wang F et al. Foxp3+ regulatory T cells are associated with the natural history of chronic hepatitis B and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012 Apr;32(4):644-55.

- 111.Shen SL et al. Foxp3+ regulatory T cells and the formation of portal vein tumour thrombus in patients with hepatocellular carcinoma.*Can J Surg*. 2011 Apr;54(2):89-94.

- 112.Xu YL et al. Expression and prognostic value of regulatory T cells and M2 macrophages in diffuse large B-cell lymphoma tissues*Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013 Jun;35(6):450-5

- 113.Zhou S. et al. CCR7 expression and intratumoral FOXP3+ regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer. *PLoS One*. 2013 Sep 5;8(9):e74430.

114. Jin F. L. et al. The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma *BJU INTERNATIONAL* | 103, 399 – 405 |
115. Helal TE et al, Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: relation to prognostic variables. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013 Apr-Jun;56(2):89-93
116. Mhawech-Fauceglia P. Intraepithelial T cells and tumor-associated macrophages in ovarian cancer patients. *Cancer Immun.* 2013;13:1. Epub 2013 Jan 15.
117. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP. Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes in thymus and proliferation independent. *Cancer Res.* 2006;66:4488-4495.
118. Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol.* 2007;178:2155-2162.
119. Yamaguchi S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;166:7282-7289.
120. Fumiko Ichihara, Koji Kono, Akihiro Takahashi, et al. Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Gastric and Esophageal Cancers *Clin Cancer Res* 2003;9:4404-4408.
121. Ajda K et al. Suppression of Treg by anti GITR antibody enhances the antitumor immunity of IFN- α gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2013 Nov. 30. Doi: 10.1111/cas. 12332.

ÖZGEÇMİŞ
Araştırma Görevlisi
(Dr.) HALİL HAKAN ÖZGÜR

TC Kimlik No / Pasaport No:	11536816652
Doğum Yılı:	1968
Yazışma Adresi :	Yamaç M 6753-6 Sk Körfez Nar sitesi NO:10 Daire :5 35100 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-3700924
Faks :	-
e-posta :	hhozgur@mynet.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Anadolu Üniversitesi	Tıp Fakültesi	PATOLOJİ	Yüksek Lisans	2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi (Dr.)	2010-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Patoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		

	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- 2013 :Eliyatkin N¹, Top OE, Yalçın E, Zengel B, Özgür H, Aykas A, Vardar E
Phyllodes Tumor of Anogenital Mammary-like Glands with Diffuse
Pseudoangiomatous Stromal Hyperplasia. Türk Patoloji Dergisi, 2013 Nov
7. doi: 10.5146/tjpath.2013.01200. [Epub ahead of print]
- 2013 :Sevin G¹, Özsarlak-Sozer G, Keles D, Gökçe G, Reel B, Özgür HH, Oktay
Taurine inhibits increased MMP-2 expression in a model of oxidative
stress induced by glutathione depletion in rabbit heart. Eur J Pharmacol
2013 Apr 15;706(1-3):98-106. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.052. Epub
2013 Mar 14.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

- 2006 : H.Hakan Özgür, A.A.İğdem, N. Erdoğan, Gastrik Adenokarsinomlarda
HER 2-Neu (c-erbB 2)ekspresyonunun klinik ve patolojik parametreler
ile karşılaştırılması ve prognostik önemi, Çalışma, 18. Ulusal Patoloji
Sempozyumu, Çeşme
- 2004 : H.H.Özgür, Ü.S.Tetik Kurt,N.Erdoğan, A.Çolak, İntraserebral yerleşimli
multifokalite gösteren Paraganglioma, Poster sunumu, XVII. Ulusal

	Patoloji Sempozyumu, Gaziantep
2004	:H.H.Özgür, E.Şahan, N.Erdoğan, Myofibrom, Poster Sunumu, XVII. Ulusal Patoloji Sempozyumu, Gaziantep
2003	:T.Saygın, A.A.İğdem, İ.Hazar, H.H.Özgür, N.Erdoğan, Mesanenin Karsinosarkomu, Poster Sunumu, XVI.Ulusal Patoloji Kongresi, Konya

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :23/02/2014

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

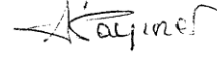
Etik Kurul Sekreteri
Hatice İÇCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 23 Temmuz 2009 tarih ve 26/17/2009 no.lu toplantısında; 211/2009 Protokol numaralı Onkoloji Enstitüsü Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Uğur YILMAZ'ın proje yöneticisi Dr. Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu, "Hepatopankreatobilier tümörlerde düzenleyici T lenfositler ve prognostik önemi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.A.Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54