



**PANKREAS ADENOKARSİNOMLARINDA
CD4, CD8, FOXP3 EKSPRESYONLARININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ VE PROGNOSTİK
PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRILMASI
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Arş. Grv. Dr. Tuba Yiğit**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Özdemir**

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2020

T. C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREAS ADENOKARSİNOMLARINDA CD4,
CD8, FOXP3 EKSPRESYONLARININ
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ VE PROGNOSTİK
PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
ARŞ. GRV. DR. TUBA YİĞİT

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ÇİĞDEM ÖZDEMİR

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Kurulu Birimince 19.TUS.007 proje numarası ile
desteklenmiştir.

AFYONKARAHİSAR 2020

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı: Pankreas adenokarsinomlarında CD4, CD8, FOXP3 ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve prognostik parametrelerle karşılaştırılması

Tezi Hazırlayan : Arş. Gör. Dr. Tuba YİĞİT
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÖZDEMİR

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ONAY

DEKAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her aşamada bana destek olan ve bilgilerinden sürekli yararlandığım tez danışmanım Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Özdemir başta olmak üzere, öğrendikçe daha çok sevdiğim patoloji eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan hocalarım Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Çiğdem Tokyol, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nilay Şen Korkmaz ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Şeyma Yalçın'a,

Tez çalışmam esnasında bana destek olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Suna Sarı, Arş. Gör. Dr. Gözde Kurtuluş, Arş. Gör. Dr. Merve Şahin, Arş. Gör. Dr. Cansu Narin ve Arş. Gör. Dr. Yiğit Şenol'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına,

Tez çalışmama verdiği maddi destekten ötürü Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığına,

Hep yanımda olan, sevgisini ve desteği daima hissettiğim eşim Yunus Emre'ye, varlığıyla beni motive eden kızım Defne'ye ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar ÇİZELGESİ	V
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	VII
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2-GENEL BİLGİLER	3
2.1-PANKREAS EMBRİYOLOJİSİ	3
2.2-PANKREAS ANATOMİSİ	5
2.2.1-Pankreasın Bölümleri ve Komşulukları	6
2.2.2-Pankreasın Kanalları	7
2.2.3-Pankreasın Arteriyal ve Venöz Dolaşımı	8
2.2.4-Pankreasın Lenfatik Drenajı	10
2.2.5-Pankreasın Sinirleri	10

2.3-PANKREASIN HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ.....	10
2.4-PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOM	14
2.4.1-Genel ve Klinik Özellikler.....	14
2.4.2-Lokalizasyon ve Gros Özellikler	16
2.4.3-Mikroskopik Özellikler.....	18
2.4.4-Histolojik Alt Tipler.....	24
2.4.5-Morfolojik Paternler	25
2.4.6-İmmünohistokimyasal Özellikler	25
2.4.7-Moleküler Genetik Özellikler.....	26
2.4.8-Prognostik Parametreler.....	27
2.4.9-TNM Klasifikasyonu ve Evreleme.....	28
2.4.10-Pankreatik Duktal Adenokarsinomun Derecelendirmesi	31
2.5-İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER.....	32
2.5.1-CD4 ve CD8	32
2.5.2-Treg'ler ve FOXP3	34

3-GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1-OLGU SEÇİMİ	42
3.2-HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME	42
3.3-İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM.....	43
3.4-İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	50
3.5-İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME	54
4-BULGULAR.....	55
5-TARTIŞMA.....	67
6-SONUÇLAR	76
7-ÖZET.....	84
8-SUMMARY	86
9-KAYNAKLAR.....	88

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo 1: Pankreatik intraepitelyal neoplazilerin sınıflandırılması	22
Tablo 2: Pankreatik duktal adenokarsinomlarda evreleme	31
Tablo 3: nTreg'ler ile iTreg'lerin karşılaştırılması	35
Tablo 4: İmmunohistokimyasal double boyama uygulama prosedürü	43
Tablo 5: Vakaların tanımlayıcı özellikleri	56
Tablo 6: Tümör çapı ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	58
Tablo 7: Diferansiasyon derecesi ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	59
Tablo 8: Tümör evresi ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	60
Tablo 9: Lenfovasküler invazyon ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	61
Tablo 10: Perinöral invazyon ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	62

Tablo 11: Lenf nodu tutulumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	63
---	----

Tablo 12: Cerrahi sınır tümör durumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	64
---	----

Tablo 13: Çevre doku invazyonu durumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması	64
--	----

Tablo 14: Pozitif boyanma miktarlarının korelasyon analizi	66
--	----



ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. Pankreas embriyolojisi; dorsal ve ventral pankreas	4
Şekil 2. Pankreas embriyolojisi; dorsal ve ventral pankreasın birleşimi	5
Şekil 3. Pankreasın bölümleri ve komşulukları	7
Şekil 4. Pankreasın kanalları	8
Şekil 5. Pankreasın arterleri	9
Şekil 6. Pankreasın venleri	9
Şekil 7. Pankreas asinüsünün yapısını gösteren şematik çizim	11
Şekil 8. Pankreasın lobüler yapısı ve Langerhans adacıkları	13
Şekil 9. İyi diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom	20
Şekil 10. Orta diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom	20
Şekil 11. Az diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom	21
Şekil 12. Pankreatik intraepitelyal neoplazi	23
Şekil 13. T hücrelerin gelişimi ve farklılaşması	34

Şekil 14. nTreg hücrelerin baskılayıcı mekanizması	37
Şekil 15. CD8 ve FOXP3 double boyama.....	52
Şekil 16. CD4 ve FOXP3 double boyama.....	53



1-GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreatik duktal adenokarsinom, yaygın olarak pankreatik kanser olarak bilinir, ABD ve Japonya'da kanser ilişkili ölüm nedenlerinde sırasıyla 4. ve 5. sıradadır (1). Agresif gelişir, erken metastatik yayılım yapar, 5 yıllık sağkalımı %5'in altındadır ve sadece %20 oranında hasta tanı anında cerrahi ile tedavi edilebilir (2). Ayrıca pankreatik duktal adenokarsinom kemoterapi ve radyoterapiye en dirençli kanserler arasındadır (3).

Kanser araştırmaları genellikle kanser gelişimi, ilerlemesi, metastazı, altında yatan genotipik ve fenotipik değişimleri incelemeye odaklanır. Solid tümörlerin bu yönlerinin aksine güncel çalışmalar tümör mikroçevresinin FOXP3+ T regulatuar (Treg) hücreleri, CD4+ veya CD8+ T hücreleri ve diğer kritik elemanlarına ışık tutmaktadır (4). Başlangıçta otonom hastalıklar bağlamında tanımlanmış olan T hücresinin aracılık ettiği immün tepkileri baskıladığı bilinen Treg hücrelerin günümüzde kansere karşı immunitiyi engellemede önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (5). Pankreatik duktal adenokarsinom hastalarında hem periferik kanda hem de tümör mikroçevresinde Treg hücre prevalansının yükseldiği ve Treg hücre infiltrasyonunun tümör patolojisi ve prognozu ile doğrudan ilişkisi olduğu iyi bir şekilde belgelenmiştir (6). Treg hücreleri, FOXP3'ün ekspresyonu ile tanımlanır, ancak FOXP3 ekspresyonu, aktive olmuş hücrelerde (CD8+ T hücreler, aktive CD4+ T hücreler gibi) geçici olarak indüklenebilir. CD8+ FOXP3+ T hücrelerin CD4+ FOXP3+ hücelere kıyasla kansere karşı immunitiyi engellemede daha az etkisi olduğu gösterilmiş olmakla beraber bu konuda çalışmalar devam etmektedir (7). Ayrıca Treg hücreleri yanı sıra tümör mikroçevresinde, pankreatik duktal adenokarsinomda normal pankreasa kıyasla infiltre olan yoğun bir T hücresi popülasyonu olduğu görülmüştür (8). Bu T hücreleri CD4 veya CD8 için pozitif olarak tanımlanmıştır. Bu tümör infiltrasyonu yapan lenfosit popülasyonunun düzenlenmesinin CD4+ ve CD8+ T hücrelerin oranlarının daha yüksek

olduğu hastalarda ilerlemiş prognoz ile klinik korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (9, 10).

Biz de çalışmamızda; pankreatik duktal adenokarsinomlarda tümör mikroçevresinde FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD4+ FOXP3+ hücreler ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarının/varlığının prognostik önemini ve CD4+ T hücrelerin CD8+ T hücrelere oranının prognostik önemini araştırmayı hedefledik.



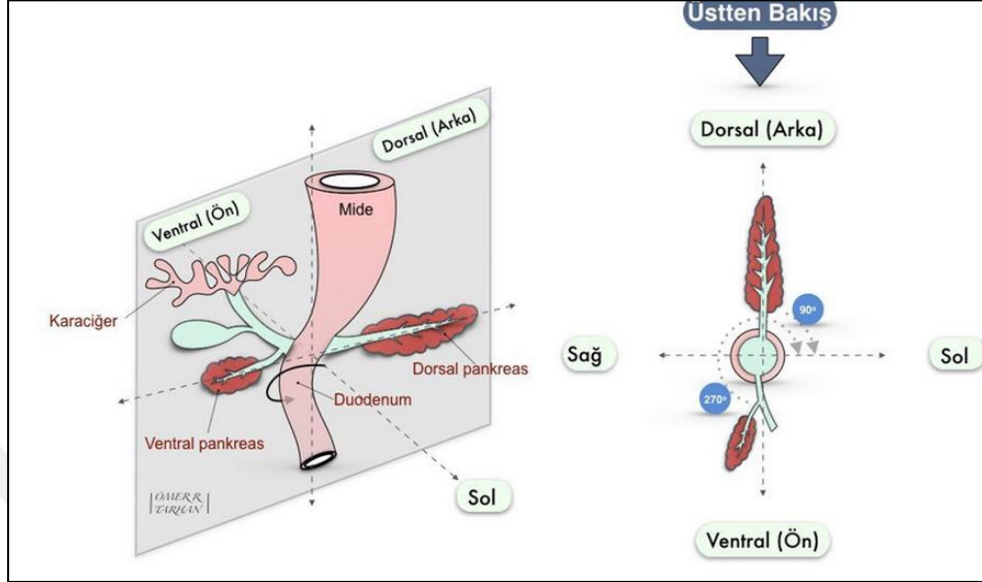
2-GENEL BİLGİLER

2.1- PANKREAS EMBRİYOLOJİSİ

Pankreas dorsal ve ventral olmak üzere ayrı iki taslaktan gelişir (11, 12) (Şekil 1). Dorsal taslağı intrauterin hayatın 4. haftasında primitif duodenumun arka duvarında, karaciğer taslağının biraz yukarısında bir çıkıntı şeklinde meydana gelir ve pankreasın büyük kısmını oluşturur. Bu taslak, dorsal mezenteriumun iki yaprağı arasında arkaya ve yukarıya doğru büyümeye başlar. Pankreasın daha küçük bölümünü oluşturan ventral taslak, önce duodenumun ventral (ön) tarafında, karaciğer taslağının bağırsaktan çıktığı yerde, sağ ve sol olmak üzere iki çıkıntı halinde görülür. Fakat bunlardan soldaki çıkıntı gelişemez ve pankreasın ventral taslağı yalnız sağ çıkıntıdan oluşur (11). Bu çıkıntı da dorsal mezenteriumun iki yaprağı arasında arkaya doğru uzanır ve gittikçe pankreasın dorsal taslağına yaklaşır (11, 12). Önce boru şeklinde olan bu taslaklar, birçok yan dallar verir ve bu dalların etrafında epitel hücreleri çoğalarak lobçukları oluşturur.

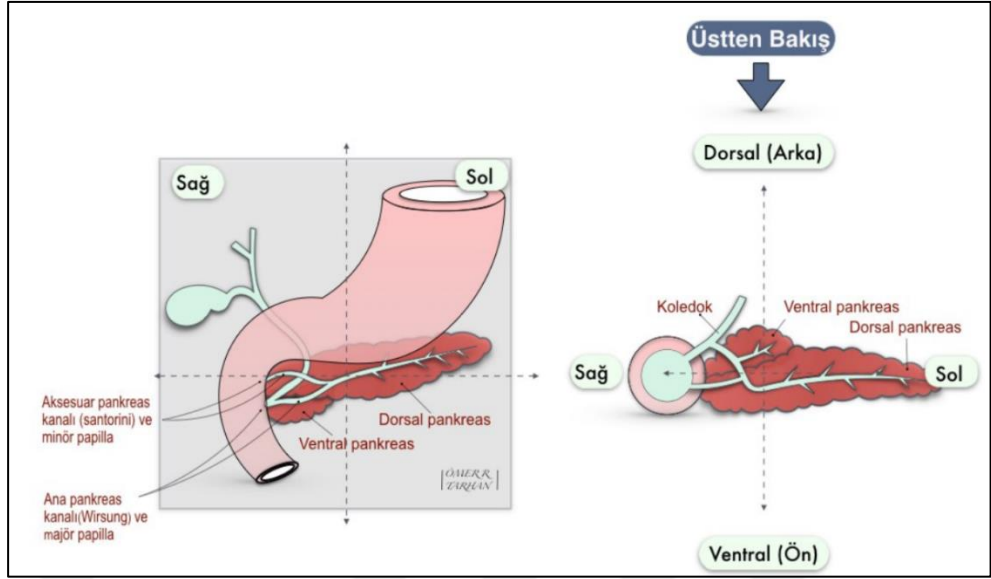
Dorsal ve ventral taslaklar, intrauterin hayatın 7. haftasında birleşirler (11) (Şekil 2). Dorsal taslaktan pankreas başının yukarı-arka kısmı, gövdesi ve kuyruğu; ventral taslaktan da uncinat proçes, başın aşağı ve ön kısmı gelişir (11, 12). Her iki taslağın büyük kanalları, bezin içinde birleşir (11). Dorsal taslağın kanalı ekseriyetle distal tarafından kapanır ve bağırsakla olan irtibatını kaybeder (11, 12). Ventral taslağın kanalı ise gelişerek, bezin büyük kanalı olan ana pankreatik kanalı (Wirsung kanalı) oluşturur. Bazen dorsal taslak da, bağırsakla olan irtibatını devam ettirir ve salgısını bir kanal aracılığı ile duodenuma boşaltır (11). Aksesuar pankreatik kanal (Santorini kanalı) adını verdiğimiz bu kanal, Wirsung kanalının açıldığı majör duodenal papillanın biraz yukarısındaki minör duodenal papillaya açılır (11, 12).

Vakaların yaklaşık %10'unda, kanal sistemi birleşemez ve orijinal çift sistem devam eder.



Şekil 1. Pankreas embriyolojisi; dorsal ve ventral pankreas gelişimi (13).

Fetal yaşamın üçüncü ayında, pankreatik adacıklar (Langerhans adacıkları) pankreatik parankim dokudan gelişir ve pankreas boyunca saçılır. İnsülin sekresyonu yaklaşık olarak beşinci ayda başlar. Glukagon ve somatostatin salgılayan hücreler de parankimal hücrelerden gelişir. Pankreas tomurcuklarını çevreleyen visseral mezoderm pankreatik bağ dokusunu oluşturur (12).



Şekil 2. Pankreas embriyolojisi; dorsal ve ventral pankreasın birleşimi (13).

2.2- PANKREAS ANATOMİSİ

Pankreas hem iç hem de dış salgı yapan alveoler yapıda çok önemli karışık bir bezdir. Pankreasın uzunluğu, kadavra fikse edildikten sonra çıkarılırsa 12-15 cm kadardır. Fikse edilmeden çıkarılırsa yayılır ve uzunluğu 20 cm'e kadar çıkar. Bütün organlarda olduğu gibi şahsa göre değişmekle beraber pankreasın ağırlığı yaklaşık kadınlarda 85, erkeklerde 100 gr'dır. Erkeklerde kadınlara göre biraz daha büyüktür. Çok yumuşak bir organ olan pankreas, grimsi pembe renklidir ve dış yüzünde hafif lobülenmeler görülür.

2.2.1- Pankreasın Bölümleri ve Komşulukları

Pankreas; baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden oluşur (Şekil 3).

Baş kısmı, duodenumun ilk 3 ve bazen de 4 bölümünün oluşturduğu kavsin içinde ve 1., 2. ve 3. lumbal vertebraların sağında yer alır. Pankreas başının ön yüzünün sağ ve yukarı kısmı ekseriyetle peritonsuzdur ve transvers kolonun başlangıç kısmına gevşek bir bağ dokusuyla yapışır. Bu sahanın altında kalan kısım peritonla örtülüdür ve burada pankreas başı ince barsak kıvrımları ile komşuluk yapar. Pankreas başının arka yüzü koledok kanalı, hepatik portal ven, superior mezenterik arter, sağ böbrek arteri ve bunların derininde yer alan inferior vena kava ve sol böbrek veni ile komşudur.

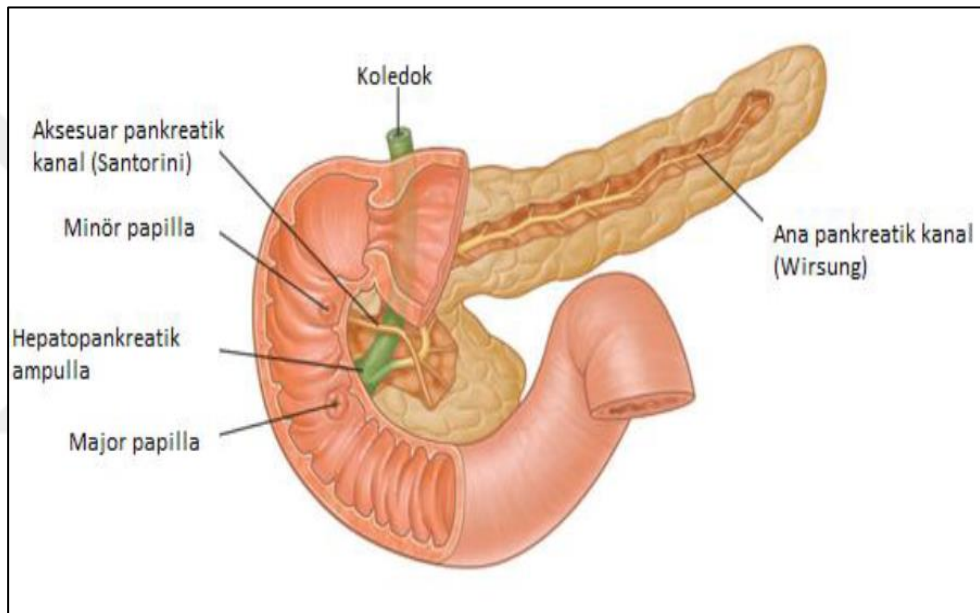
Unsinat proçes, pankreas başının alt kısmında bulunan orta çizgiye doğru uzanan bir çıkıntıdır. Unsinat proçes ile pankreas gövdesi arasında bulunan ve açıklığa bakan çentikten superior mezenterik arter ve ven geçer.

Boyun kısmı, yaklaşık 2-2,5 cm uzunluğunda olup, pankreas başından sola, öne ve yukarı doğru uzanır. Belirgin bir sınır göstermeksizin pankreas başı ile birleşir. Arka yüzü superior mezenterik ven ve hepatik portal ven ile komşudur.

Gövde kısmı, pankreasın en büyük bölümü olup, 1. ve 2. lumbal vertebra hizasında sağdan sola ve biraz da yukarıya doğru uzanır. Fikse edildikten sonra çıkarılan pankreas gövdesi, üç yüzlü ve üç kenarlı prizmaya benzer. Ön yüz midenin arka yüzü ile, alt yüz ince barsak kıvrımlarıyla, arka yüz peritonsuz olup aort, superior mezenterik arterin başlangıcı, sol böbrek arteri, diyaframın sol kısmı, sol böbrek ve sol böbrek üstü bezi ile komşudur.

de arka yüzünde koledok kanalıyla bir araya gelir. Bu iki kanal yan yana seyrederek, duodenum duvarına sokulurlar ve burada 15 mm kadar oblik bir şekilde aşağıya uzandıktan sonra, bazen birleşerek, bazen de ayrı ayrı iki delikle majör duodenal papillaya açılırlar (Şekil 4).

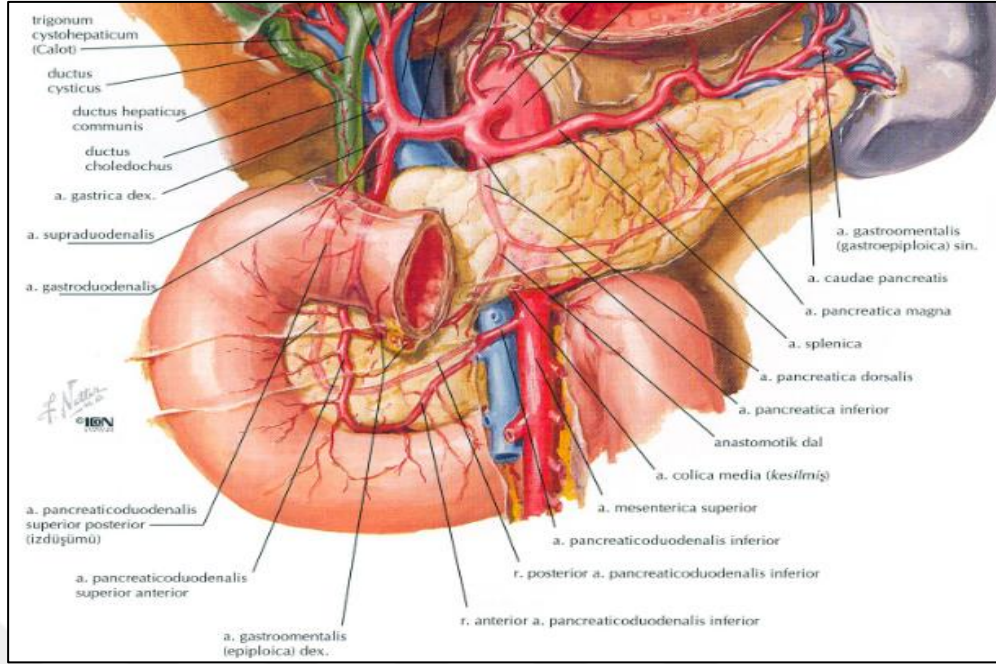
Aksesuar pankreatik kanal (Santorini kanalı): Pankreasın dorsal taslağına aittir ve ekseriyetle erişkinlerde duodenum ile olan bağlantısını kaybeder. Bu kanal pankreasın başında bulunur (Şekil 4).



Şekil 4. Pankreasın kanalları (13).

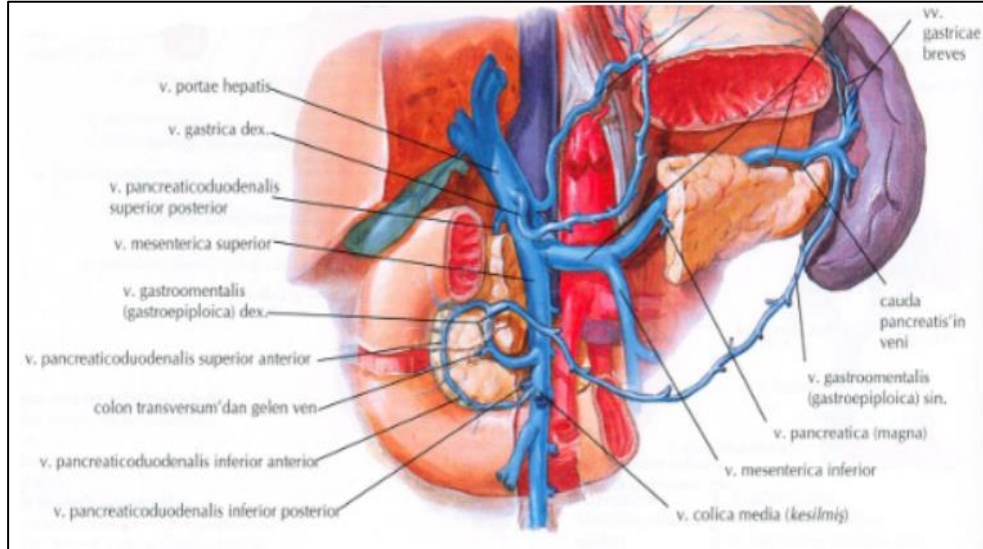
2.2.3- Pankreasın Arteriyal ve Venöz Dolaşımı

Arterleri; splenik arter pankreasın gövde ve kuyruk kısımlarını, superior ve inferior pankreatikoduodenal arter de baş kısmını besler (Şekil 5).



Şekil 5. Pankreasın arterleri (14).

Venleri; çoğu splenik vene olmak üzere, hepatik portal vene ve superior mezenterik vene açılır (Şekil 6).



Şekil 6. Pankreasın venleri (14).

2.2.4- Pankreasın Lenfatik Drenajı

Asinuslar çevresinden başlayan lenf kapillerleri, kan damarları ile birlikte uzanır ve çoğu superior ve inferior pankreatik lenf nodu ve splenik lenf noduna, bir kısmı da superior ve inferior pankreatikoduodenal lenf noduna ve pilorik lenf noduna açılır. Buradan çıkan lenf damarları çölyak, hepatik, superior mezenterik lenf nodlarına açılırlar.

2.2.5- Pankreasın Sinirleri

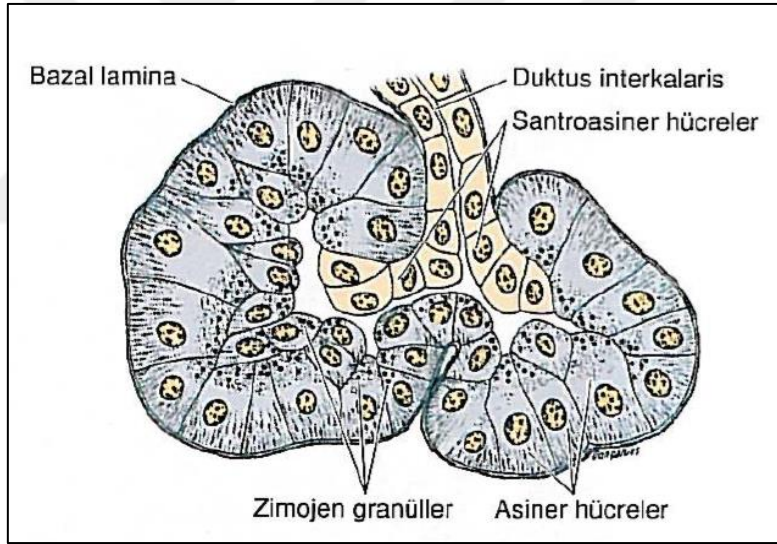
Sempatik ve parasempatik lifleri çölyak pleksustan ayrılarak splenik plexus içinde beze gelirler. Sempatik lifleri splanknik sinirler, parasempatik lifleri vagus sinirinden gelir. Parasempatik etki salgıyı artırır, sempatik etki ise azaltır. Pankreastan kaynaklanan ağrı duyusu impulsları, splanknik sinirler içinde medulla spinalise gelir (11).

2.3- PANKREASIN HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Pankreas, sindirim enzimleri üreten karışık dış salgı ve iç salgı bezidir (11, 15, 16). Enzimler asinüsler halinde düzenlenmiş dış salgı kısmın hücreleri tarafından depolanır ve salınır (15). Hormonlar Langerhans adacıkları olarak bilinen iç salgı epitelyal hücre toplulukları tarafından sentezlenir (15). Çeşitli sindirim enzimlerini içeren dış salgısını ana pankreatik kanal ile duodenuma boşaltır. İç salgısı ise doğrudan kana karışır (11). Pankreasın dış salgı kısmı bileşik asiner bir bezdir ve yapısı parotis bezine benzer (15, 16). Histolojik kesitlerde bu iki dokunun ayrımı pankreasta myoepitelyal hücrelerin olmaması ve Langerhans adacıklarının bulunmasına dayanarak yapılabilir. Başka bir karakteristik ayrıntı da pankreasta duktus interkalarisin başlangıç parçasının asinüslerin lümeni

içine penetre olmasıdır. Duktus interkalarisin bu intraasiner kısmını oluşturan hücelere sentroasiner hücreler denir (Şekil 6). Sadece pankreasın asinüslerinde bulunan bu hücrelerin çekirdekleri açık bir sitoplazmayla çevrilidir. Duktus interkalarisler, prizmatik epitelle örtülü daha geniş interlobüler kanallara açılır. Pankreatik kanal sisteminde myoepitelyal hücreler bulunmaz (15).

Dış salgı yapan pankreatik asinüs, bir lümeni saran birkaç seröz hücreden oluşur (15, 16) (Şekil 7). Bu hücreler oldukça kutuplaşmıştır, nükleusları yuvarlaktır ve tipik protein salgılayan hücrelerdir (15). Her bir hücrede bulunan zimojen granüllerin sayısı sindirim fazına bağlı olarak farklılık gösterir (15, 16).



Şekil 7. Pankreas asinüsünün yapısını gösteren şematik çizim (15).

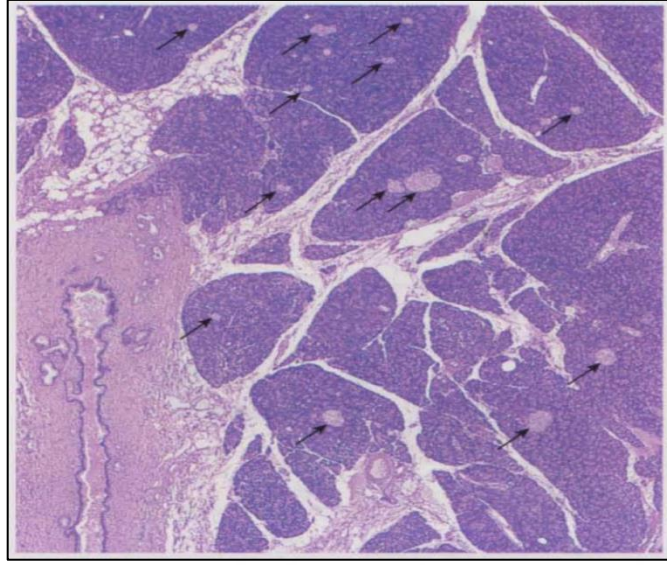
Pankreas, ince bir bağ dokusu kapsülü ile örtülüdür. Kapsülden organın içine giren bağ dokusu bölmeleri pankreası lobüllere ayırır (15, 16). Asinüsler ince bir retiküler lif kılıfı ile desteklenen bazal laminayla çevrilidir. Pankreasta ayrıca salgılama işlemi için gerekli olan zengin bir kapiller ağı bulunur (15).

İnsanda dış salgı yapan pankreas su ve iyonlara ek olarak bazı proteazlar (tripsinojen 1, 2 ve 3, kimotripsinojen, proelastaz 1 ve 2, proteaz E, kallikreinojen, prokarboksipeptidaz A1, A2, B1 ve B2), amilaz, lipazlar (trigliserid lipaz, kolipaz ve karboksil ester hidrolaz), fosfolipaz A2 ve nükleazlar (deoksiribonükleaz, ribonükleaz) salgılar. Bu enzimlerin çoğu asiner hücrelerin salgı granülleri içinde proenzim olarak depolanır; salgılandıktan sonra ince barsak lümeninde etkinleştirilir. Bu durum pankreasın korunmasında çok önemlidir (15, 16).

Pankreasın salgısı başlıca iki hormon tarafından kontrol edilir. Bunlar duodenum mukozasındaki enteroendokrin hücreler tarafından üretilen ve önceleri pankreozimin olarak isimlerinden kolesistokinin ve sekretindir. Vagus sinirinin uyarılması da (parasempatik uyarım) pankreatik sekresyonu sağlar (15).

Sekretin, bikarbonattan zengin, enzim aktivitesi yönünden fakir, bol miktarda bir sıvı salgılanmasını sağlar (15, 16). Küçük loblar arası kanal hücreleri tarafından salgılanan bu sıvı asidik kimusu nötralize eder; bu sayede pankreatik enzimler optimal nötral pH sınırları içinde fonksiyon görebilirler (15). Kolesistokinin daha az miktarda, ancak enzimden zengin bir sıvının salgılanmasını sağlar. Bu hormon esas olarak zimojen granüllerin hücreden atılmasında etkilidir (15, 16). Bu iki hormonun birlikte etkimesi enzimden zengin pankreatik sıvının bol miktarda salgılanmasına olanak sağlar (15).

Pankreasın iç salgı yapan komponenti olan Langerhans adacıkları organ boyunca değişken boyutlardaki hücre grupları halinde dağılmışlardır (16) (Şekil 8).



Şekil 8. Pankreasın lobüler yapısı ve Langerhans adacıkları (oklar). Sol altta lobüllere komşu, büyük bir interlobüler kanalın görünümü (H&E, X25) (16).

H&E boyanmış kesitlerde Langerhans adacıkları, yoğun boyanmış pankreatik asinüsler tarafından çevrelenmiş soluk boyanmış hücre kümeleri halinde görünürler (16). Adacıklarda bulunan üç ana hücre tipi, A (alfa), B (beta) ve D (delta) hücreleridir (11, 16). A hücreleri, insanlarda adacık hücre popülasyonunun %12-15'ini oluşturmaktadır ve genel olarak adacığın periferinde bulunmaktadır (16, 17). A hücreleri glukagon salgılar (11, 16). B hücreleri, insanlarda adacık hücre popülasyonunun yaklaşık %70'ini oluşturmaktadırlar ve genellikle adacıkta merkezi yerleşim gösterirler (16, 17). B hücreleri insülin salgılar (11, 16). B hücreleri dışındaki adacık hücreleri, gastrointestinal mukozanın enteroendokrin hücrelerine karşılık gelmektedir (16). D hücreleri, toplam pankreatik endokrin dokunun yaklaşık %5-10'unu oluştururlar ve bu hücreler de adacıklarda periferik yerleşimlidirler (16, 17). D hücreleri somatostatin salgılar (11, 16). Bulgular, bazı hücrelerin birden fazla hormon salgılayabileceğini göstermektedir. A hücrelerin sitoplazmasında glukagona ek olarak birkaç hormonun yer aldığı saptanmıştır. Bu hormonlar; gastrik inhibitör peptit, kolesistokinin, adrenokortikotropik hormon ve endorfindir. Adacık G hücrelerin (gastrin hücreleri) varlığına dair kesin bir morfolojik bulgu olmamasına rağmen,

gastrin de bir veya daha fazla adacık hücresi tarafından salgılanıyor olabilir (16). Ana hücrelere benzeyen ve peptid salgılayan daha küçük hücreler de bulunur (11). Bu hücrelerden pankreatik polipeptid hormonunu salgılayan hücrelere PP hücreleri denilir (11, 17). Parasempatik etki, beta hücreleri uyarak insülin salgılatır. İnsülin de glikozu glikojene çevirerek karaciğerde depo edilmesini sağlar. Sempatik etki ise, alfa hücreleri uyarak glukagon salgılatır. Glukagon da glikojeni glukoza çevirir (11).

2.4- PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOM

Çoğu ekzokrin pankreas karsinomu, duktal hücre fenotipi gösteren neoplazmlar sınıfına girer ve bu nedenle “pankreatik duktal adenokarsinom” olarak adlandırılır. “Pankreas kanseri”, “pankreas karsinomu” veya “pankreas adenokarsinomu”ndan bahsedildiğinde, aslında kastedilen bu tümör ve varyantlarıdır (18).

2.4.1- Genel ve Klinik Özellikler

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), bazı bölgelerde, kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olduğu tahmin edilen, artan insidansa sahip ölümcül bir durumdur (19, 20). Genellikle ileri evrede ortaya çıkar ve bu da beş yıllık sağkalım oranlarının %2-9 olmasına sebep olur. Pankreatik intraepitelyal neoplazi, intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar ve müsinöz kistik neoplazmlar gibi premalign durumları tespit etmek için taramadan faydalanabilecek yüksek riskli hastaların tespit edilmesi gereklidir, ancak henüz kabul edilebilir bir tarama testi tanımlanmamıştır (20).

PDAK, tüm pankreas malignitelerinin yaklaşık %85’ini oluşturmaktadır (21). Dünyada en yaygın 14. kanser ve kanser ölümlerinin en yüksek 7. nedeni olarak sıralanmaktadır (22). En yüksek standardize yaş insidansı

Avrupa ve Kuzey Amerika’da, en düşük standardize yaş insidansı Afrika ve Güney Orta Asya’dadır (23). Gelişmiş ülkelerde hem erkeklerde hem kadınlarda PDAK daha yüksek oranda görülmektedir (24). Ülkeler arasında PDAK insidansındaki büyük farklılıklar, çevresel faktörlerin hastalık için risk faktörleri olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (20).

Sağkalım üzerinde etkili olan faktörler arasında yaş, cinsiyet, mevcut sağlık hizmetlerinin kalitesi, yandaş hastalıkların varlığı ve yaşam tarzı alışkanlıkları bulunmaktadır ve bunların bazıları ülkeler arasındaki sağkalım oranlarının farkını açıklamaktadır (25). Değiştirilebilir risk faktörleri arasında sigara, alkol, kronik pankreatit, obezite, diyet faktörleri, enfeksiyon yer alır (26). PDAK için en iyi bilinen risk faktörü sigara içimidir. Sigara içenlerde içmeyenlere oranla 2-3 kat fazla görülür (18, 27). Değiştirilemez faktörler arasında yaş, cinsiyet, etnik köken, kan grubu, bağırsak mikrobiyotası, diyabet, aile öyküsü ve genetik yatkınlık yer alır (28). Bununla birlikte hastalık sonucunu etkileyen ana faktör, tanı anındaki tümör evresidir (24).

Klinik özellikler sırt ağrısı, pankreas başı tümörlerinde sarılık, açıklanamayan kilo kaybı, kaşıntı, diyabetes mellitus ve bazen gezici tromboflebit, akut pankreatit, hipoglisemi ve hiperkalsemiyi içerir (19, 29-32). Yeni başlayan diyabet (tip 3c) pankreas kanserinin ilk belirtisi olabilir. İleri hastalık belirtisi karaciğer metastazı ve/veya bitişik organ (örneğin duodenum) ya da periton boşluğunun (asit) invazyonu ile ilişkilidir (29). Bununla birlikte çoğu olguda tanı konduğu sırada tümör nispeten büyüktür (yaklaşık 5 cm) ve pankreas dışına yayılmıştır (olguların %85’inde). Gövde ve kuyruk karsinomları sinsice gelişir ve tanı anında genellikle metastaz yapmıştır. Hastaların yaklaşık %25’inde periferik venöz trombüs vardır (33, 34).

PDAK temelde “germline” ve somatik mutasyonların neden olduğu genetik bir hastalıktır (29). Pankreas kanserlerinin %10’unda genetik bir yatkınlık ile bağlantılı familiyal agregasyon gösterilmiştir. Bu tipte en az beş familiyal sendrom tanımlanmıştır: 1- BRCA2 “germline” mutasyonu gösteren familiyal meme kanseri; 2- P16 geninde “germline” mutasyonu gösteren familiyal atipik multipl melanom sendromu; 3- SKT11/LKB1 geninde “germline” mutasyonu gösteren Peutz Jeghers sendromu; 4- DNA hatalı eşleşme (“mismatch”) onarım genlerinin birinde “germline” mutasyon gösteren herediter non polipozis kolorektal kanser sendromu; 5- Katyonik tripsinojen geninde “germline” mutasyon gösteren kalıtsal pankreatit. Kronik pankreatitin PDAK için artmış risk ile pozitif ilişkili olduğu iddia edilmektedir, ancak iki hastalık arasında neden sonuç ilişkisini anlamak zordur (35-39).

Erken dönemde PDAK’ı tespit etmek için değişik derecelerde başarılı olan çeşitli teknikler kullanılmaktadır (40, 41). Bunlar içinde bilgisayarlı tomografi, nükleer manyetik rezonans, çölyak anjiyografi, sonografi, endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP), selenometionin tarama, duodenal aspirasyon ve serum testleri yer alır. Sonuncusunda kanser ilişkili çeşitli antijenlere karşı monoklonal antikorlar kullanılır (41-43). SPan-1 ve CA19-9 antijen düzeyleri ölçümü karsinoembriyogenik antijen (CEA) veya diğer belirleyicilere göre daha etkili görünmektedir, ancak henüz kabul edilebilir bir tarama testi tanımlanmamıştır (20, 41, 44).

2.4.2- Lokalizasyon ve Gros Özellikler

PDAK hastaların üçte ikisinde pankreas başında, diğer üçte birinde ise gövde veya kuyruk bölgesinde yer almaktadır (29, 45). PDAK’ın çoğu tektir, fakat nadiren multifokal hastalık da meydana gelebilir. Çok nadiren ektopik pankreatik doku pankreatik intraepitelyal lezyonlara (PanIN) ve hatta invaziv karsinoma neden olabilir (29).

Multipl tümörler olguların %20'sinde bulunur. Çoğunluğu kötü sınırlı ve serttir, kesit yüzleri gri sarı renktedir. Özellikle büyük tümörlerde mikrokistik alanlar görülebilir, hemoraji ve nekroz oldukça nadirdir (45).

Pankreas başı yerleşimli tümörler 1,5-5 cm çapında olmasına karşın gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler genellikle daha büyüktür. Pankreas başı yerleşimli tümörler genellikle ana safra kanalını ve/veya ana pankreatik kanalı (Wirsung) invaze ederler. İnvazyon darlığa neden olur ve her iki kanal sisteminde de proksimal genişleme ile sonuçlanır. Daha ileri evre tümörler duodenum papillasını ve duodenum duvarını invaze edebilir (45, 46). Pankreas başı kaynaklı tümörlerde yaygın genişleme yerleri; pankreas içinde ana safra kanalı, pankreas çevresi ve retroperitoneal yağlı doku, duodenum papillası ve duodenumdur. Perinöral invazyon bu tümörlerde yaygındır (34, 46).

Gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler ters yönde pankreatik parankimde retansiyon kist yapısı, kanal dilatasyonu ve parankimde fibröz atrofi gibi sekonder değişikliklere neden olur. Gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler ilk olarak dalağı, mideyi, sol böbreküstü bezi, peritonu ve kolonu invaze ederler (46). Ekstapankreatik yayılım sıklıkla ve yaygın olduğunda tümörün pankreas kaynaklı olup olmadığını belirlemek zor olabilir (45).

PDAK yaygın olarak pankreas çevresindeki lenf nodlarını invaze eder (34, 46). Pankreas başı yerleşimli tümörler süperior mezenterik ve ana hepatik arter ile hepatoduodenal ligamana uzanan lenf nodu zincirini invaze eder. Gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler sıklıkla superior ve inferior gövde ve kuyruk lenf nodları ve dalak hilusundaki lenf nodlarına yayılır. Paraaortik bölgeye metastaz kötü prognoz ile ilişkilidir (46).

Tümörün distalinde yer alan non neoplastik pankreas yoğun atrofi, kronik inflamasyon ve fibrozis ile birlikte duktal dilatasyon gösterebilir. Özellikle familiyal olgularda prekanseröz lezyonlar olan pankreatik intraepitelyal lezyonlar (PanIN) görülebilir (47).

2.4.3- Mikroskopik Özellikler

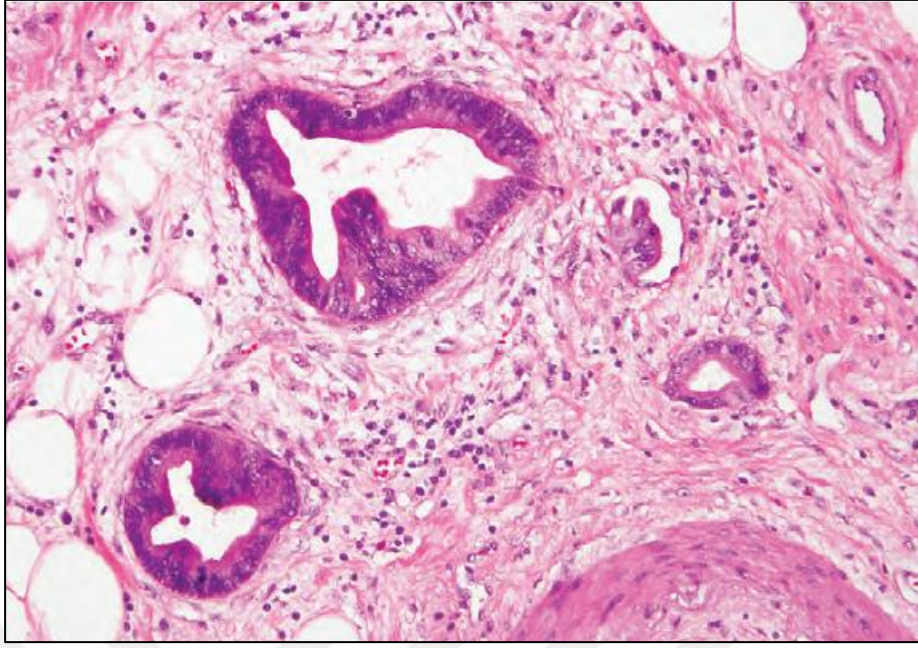
PDAK'ların çoğu iyi-orta derecede diferansiyedir. Pankreas parankimine gelişigüzel dağılmış ve güçlü bir desmoplastik stromal yanıt ortaya çıkaran duktus benzeri glandüler yapılar oluşturur. İyi diferansiye karsinomlarda, neoplastik glandlar olarak tanınması zor olabilen kanal benzeri yapılar (Şekil 9), adenokarsinom için daha tanısal olan açısız konturlu, dallanmış duktuslar, rüptüre olmuş glandlar ve/veya kribriiform paternli çok katlı papiller epitel içeren glandlar ile yan yana ortaya çıkar. En karakteristik olan müsin gölcüğü içinde, selüler stromanın kısmen kapladığı rüptüre glandlardır. Bu bezlerin lümeninde hücre kalıntıları ve birkaç nötrofil bulunabilir. Nadiren karsinom histolojisine geniş bir duktus yapısı hakimdir. Orta derece diferansiye adenokarsinomlarda, geniş kribriiform yapıda glandlar içeren, papiller, mikropapiller, girus benzeri yapılardan oluşan intratümöral heterojenite daha belirgindir (Şekil 10). Daha küçük ve daha düzensiz gland odakları ile tek tek duran pleomorfik hücreler sıklıkla tümör sınırlarında bulunur. Hem iyi diferansiye hem de orta derece diferansiye glandlarda yaygın olan, neoplastik glandları içine alan, bazen duktosentrik yapıda olabilen desmoplastik bir stromadır. Stroma hipovaskülerdir ve sıklıkla fibroblastlar, myofibroblastlar, saçılmış lenfositler ve makrofajlar ile serpiştirilmiş kollajen liflerden oluşur.

Neoplastik hücreler kolumnar-küboidaldir ve Alcian mavisi ve PAS ile boyanan müsin üretirler. Neoplastik hücrelerin sitoplazması eozinofiliktir, ancak bazen köpüksü, hatta berrak olabilir. Çekirdekler yuvarlaktan ovale

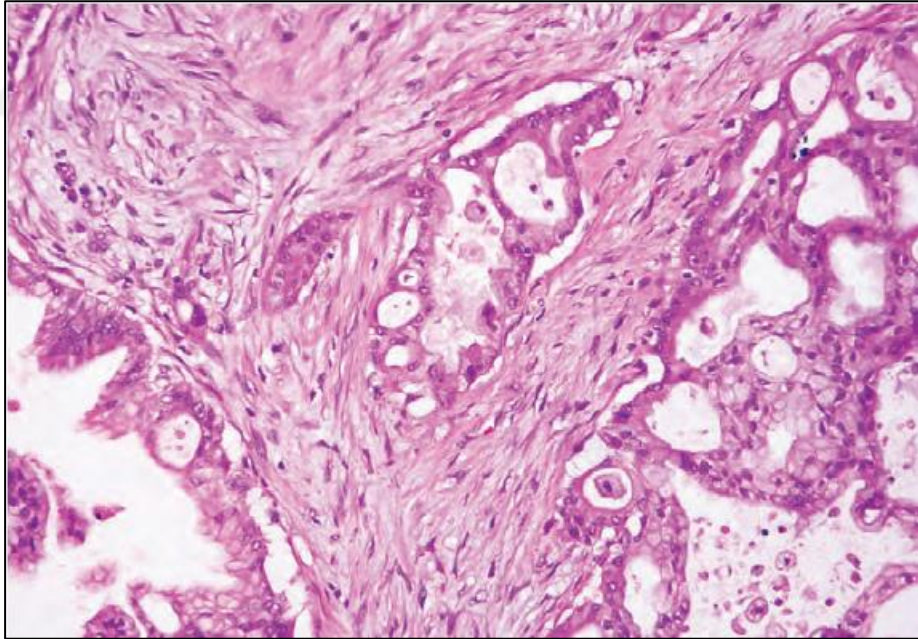
hafif pleomorfiktir. Bazen neoplastik olmayan hücrelerin çekirdeklerinin 3-4 katından daha büyük çekirdekleri vardır. Nükleoller genellikle belirgindir ve mitotik oran orta düzeydedir.

Neoplastik glandlar peripankreatik yağ dokusunu (intralobüler septadan sonra) ve sinirler, damarlar, duktuslar gibi önceden var olan yapıları infiltre edebilir. Bazı neoplastik glandlar yağ dokuda ayrı ayrı uzanabilir (çıplak kanallar) veya duodenum ve ampullayı mukoza üzerinden invaze edebilir. Periferik sinir invazyonu yaygındır ve pankreasın içinde ve dışında özellikle sinirlerin bol olduğu yerlerde görülür. Perinöral invazyon yüksek dereceli tümör için spesifik bir bulgudur; bir sinirde neoplastik olmayan glandüler inklüzyon son derece nadirdir. Lenfatik invazyon peripankreatik dokuda bulunur ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir. Adenokarsinom damarları invaze ettiğinde vasküler endotelin yerini alabilir ve hatta PaIN'i taklit edebilir. Karsinomlar duktusların kanserizasyonu adı verilen bir süreç ile geri dönüp neoplastik olmayan duktusları invaze edebilir. Perinöral invazyon, venöz invazyon ve duktusların kanserizasyonu invaziv karsinomun ana neoplastik kitlenin çok ötesine ulaşmasını sağlayan yollardır.

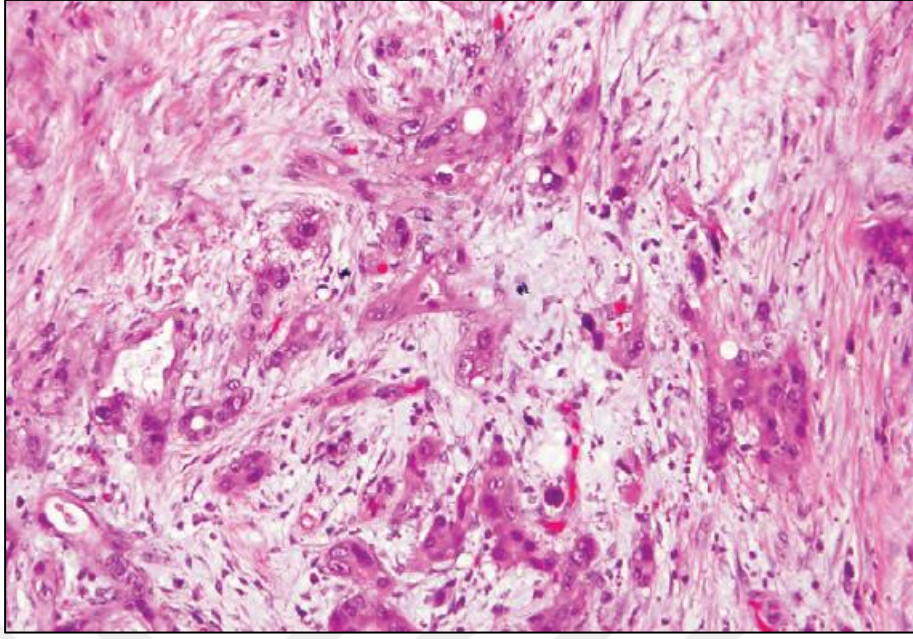
Az diferansiye duktal adenokarsinomlar heterojendir ve solid veya kribriform hücre tabakalarından ve gevşek düzenlenmiş stroma içine yerleşmiş tek tek duran pleomorfik hücrelerden oluşur (Şekil 11). Nekroz ve kanama odakları oluşabilir. Pleomorfik neoplastik hücreler (bazen skuamoid veya iğsi hücre farklılaşması ile) düzgün sıralanmazlar, müsini çok az üretir ya da hiç üretmezler, birçok mitozla sahiptirler. Neoplastik doku parankimi tahrip eder ve peripankreatik dokuya geniş ölçüde sızabilir. İntraduktal tümör ekstansiyonu daha iyi diferansiye karsinomlara göre daha az görülürken perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu eşit derecede yaygındır (29).



Şekil 9. İyi diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom (48).



Şekil 10. Orta diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom (48).

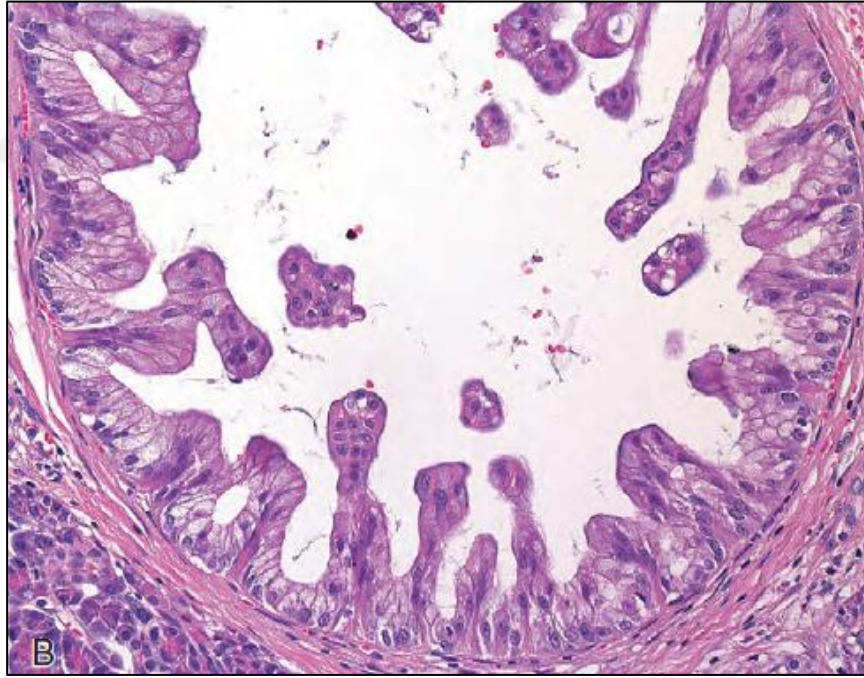
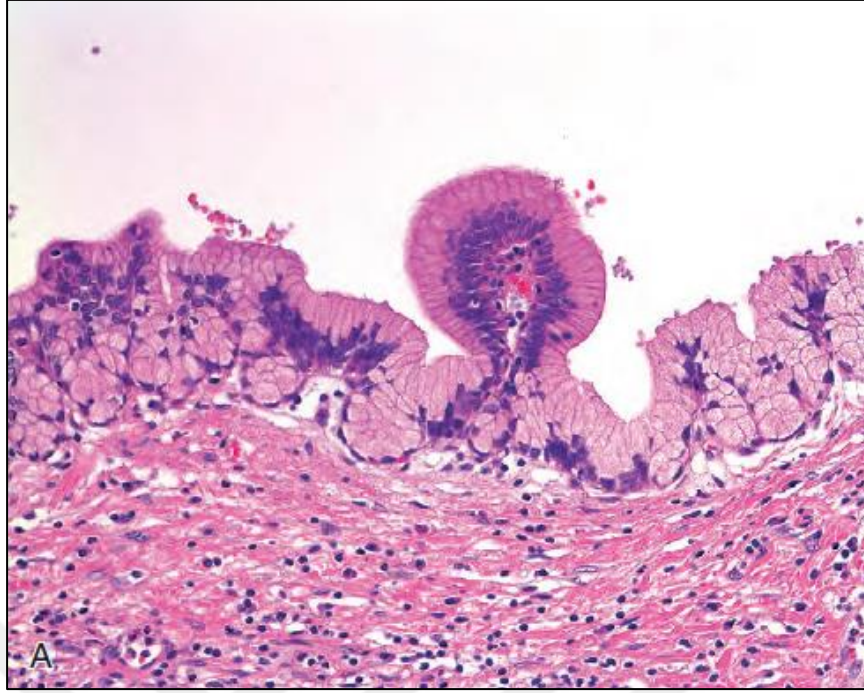


Şekil 11. Az diferansiye pankreatik duktal adenokarsinom (48).

Peritümöral dokunun orta büyüklükteki duktuslarında, genellikle papiller oluşumlarla kombine edilmiş uzun kolumnar müsinöz hücrelerin, duktus epitelinin yerini aldığı gözlenir. Bu lezyonlar karsinom için tümöre özgü değildir, ancak PDAK ile ilişkili olarak, ilişkili olmayan lezyonlardan daha yaygındır. Bu ilişki ve lezyonların invaziv adenokarsinomla paylaştığı çeşitli genetik anormallikler nedeniyle, bu kanal değişiklikleri prekürsör lezyonlar olarak kabul edilir ve PanIN, derece 1 ila 3 olarak adlandırılır (48, 49) (Tablo 1). Son zamanlarda, PanIN'i sınıflandırmak için önceki üç katmanlı sistem (PanIN-1'den 3'e kadar), iki katmanlı (daha önce PanIN-1 (Şekil 12A) ve PanIN-2 olarak sınıflandırılan lezyonlar artık düşük dereceli lezyonlar olarak -ve genellikle klinik olarak önemsiz olarak kabul edilmektedir- ve PanIN-3 (Şekil 12B) yüksek dereceli lezyon olarak) sınıflandırılmaktadır. Ayrıca invaziv duktal adenokarsinom için rezeksiyon marjında herhangi bir derece PanIN varlığı hastanın hayatta kalmasını etkilememektedir (50).

PanIN-1A	Bazal yerleşimli çekirdekler ve bol miktarda supranükleer müsin içeren kolumnar hücrelerden oluşan düz epitelyal lezyonlar. Birçok PanIN-1A vakasının neoplastik doğası kesin olarak belirlenmediğinden, bu duktus değişiklikleri için “lezyon” terimi kullanılabilir.
PanIN-1B	Papiller, mikropapiller veya temel olarak psödostratifiye mimariye sahip olan ancak diğer yönlerden PanIN-1A ile özdeş olan epitelyal lezyonlar
PanIN-2	Düz olabilen ancak çoğunlukla papiller olan müsinöz epitel lezyonları. Tanım olarak, bu lezyonların PanIN-3'te görülenlerden daha az olan bazı nükleer anormalliklere sahip olması gerekir.
PanIN-3	Genellikle şiddetli hücresel atipisi olan papiller veya mikropapiller lezyonlar. Lezyonlar sitonükleer düzeyde karsinoma benzemektedir, ancak bazal membrandan invazyon yoktur.

Tablo 1: Pankreatik intraepitelyal neoplazilerin sınıflandırılması (48).



Şekil 12. Pankreatik intraepitelyal neoplazi. A: PanIN1, B: PanIN3 (48).

2.4.4- Histolojik Alt Tipler

Pankreatik duktal adenokarsinomun histolojik alt tipleri (WHO 2019);

- Adenoskuamöz karsinom,
- Kolloidal (müsinöz non-kistik)karsinom,
- Hepatoid karsinom,
- Medüller karsinom,
- İnvaziv mikropapiller karsinom,
- Taşlı yüzük hücreli karsinom,
- Andiferansiye karsinom,
 - Anaplastik andiferansiye karsinom,
 - Sarkomatoid andiferansiye karsinom,
 - Karsinosarkom,
- Osteoklast benzeri dev hücre içeren andiferansiye karsinom,
- Rabdomyoid fenotipte büyük hücreli karsinom şeklindedir (18, 29, 34).

2.4.5- Morfolojik Paternler

PDAK'ın prognozu değiştirmedikleri ve spesifik bir alt tip olarak sınıflandırılmayı sağlayan farklı biyolojik davranışlara veya klinik semptomatolojiye sahip olmadıkları için alt tipler arasında yer almayan morfolojik paternleri vardır. Bunlar büyük duktus paterni, "foamy" gland paterni, şeffaf hücreli patern ve kistik papiller paternidir (29).

2.4.6- İmmünohistokimyasal Özellikler

Çoğu PDAK, MUC1, MUC3, MUC4 ve MUC5AC dahil olmak üzere hücre yüzeyi ile ilişkili müsinleri eksprese eder. İmmünohistokimyasal olarak, glikoprotein MUC1 (EMA), invaziv duktal karsinomların %80'inden fazlasında ve benzer oranda yüksek dereceli PanIN'lerde eksprese edilir. Bu durum ikisi arasında patogenetik bir ilişkiyi destekler. Kolloidal karsinomlar, ampullar karsinomlar ve kolorektal karsinom daha çok MUC2 pozitifdir. MUC6, PDAK'ların yaklaşık üçte birinde eksprese edilir (45).

Günümüzde PDAK'ı, ekstrapankreatik müsin üreten adenokarsinomlardan özellikle de safra yolu karsinomları ve gastrik karsinomlardan kesin bir şekilde ayıran immünohistokimyasal bir belirteç yoktur. CK7, CK8, CK18 ve CK19 tutarlı bir şekilde eksprese edilir. CEA, CA19-9, CA125, B72.3, DUPAN-2 genellikle pozitifdir. Bununla birlikte, bu belirteçlerin bazıları özellikle kronik pankreatitte normal duktus hücrelerinin apikal hücre zarlarını da işaretler.

PDAK'lar genellikle vimentin ve (nadir istisnalar dışında) nöroendokrin markerler (sinaptofizin, kromogranin) veya asiner markerler (tripsin, BCL10) için negatiftir.

SMAD4 (DPC4) ve p16 (CDKN2A)'nın nükleer ekspresyonları sırasıyla karsinomların %55 ve %75'inde kaybolur. P53 nükleer ekspresyonu kanserlerin %75-80'inde aşırı ekspresyon olması ya da hiç ekspresyon olmaması (null patern) şeklinde değişkendir. PDAK'larda aşırı ekspresyonu bildirilen diğer belirteçler arasında EGF ve reseptörü ERBB2 (c-erbB2, HER2), TGF-alfa ve TGF-beta, PDGFA ve PDGFB, VEGF ve reseptörleri, metallothionein, CD44v6, claudin-4, ANXA8, ADAM9, K homoloji domain içeren protein (KOC), S100A4, S100A6 ve S100P yer alır (29).

2.4.7- Moleküler Genetik Özellikler

Sitogenetik olarak sıklıkla 1p, 3p, 6p, 8p ve 17p'de lokalize genlerde yapısal yeniden düzenlenmeler (veya kayıp) bulunmuş olup pankreatik karsinogenezde önemli olduğu görülmüştür (45). KRAS onkogeninin aktive edici mutasyonları %90'dan fazla olguda bulunmaktadır ve erken genetik bir değişimi temsil etmektedir (45, 49, 51, 52). PDAK'ların çoğu p16 (CDKN2A) tümör baskılayıcı geninin inaktive edici mutasyonunu gösterir. Olguların bir kısmında p53 ve SMAD4 (DPC4) tümör baskılayıcı genlerinin inaktive edici mutasyonları vardır. Çok daha düşük bir frekansta değiştirilen genler arasında MKK4 geni (bu gen TGF- β reseptörleri R1 ve R2 içindir), BRCA2 geni ve LKB1 / STK11 geni bulunur (41, 48, 52). PDAK'da bulunan bir diğer moleküler değişim ise DNA hatalı eşleşme onarım geninin ekspresyonunda kayıp nedeniyle gelişen mikrosatellit instabilitesidir. DNA ploidi analizlerinde bu tümörlerin yaklaşık yarısında anöploid paternler görülmüştür, insidans az diferansiye formlarda daha yüksektir (45).

2.4.8- Prognostik Parametreler

PDAK hemen hemen tüm vakalarda ölümcüldür. Tedavi edilmeyen hastaların ortalama sağkalım süresi 3-5 aydır ve cerrahi rezeksion sonrası ortalama sağkalım süresi 10-20 aydır. Hastaların sadece %10-20'sinde tanı anında cerrahi olarak rezektabl karsinomlar vardır. Toplam 5 yıllık sağkalım oranı %8'dir. Cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilen hastaların oranı %15-20'dir.

Rezektabilite, prognozun en önemli belirleyicisidir. Bununla birlikte, cerrahi olarak rezeke edilen karsinomların %70-90'ı, ameliyattan sonraki 2 yıl içinde en yaygın olarak pankreas yatağında ve daha uzaktaki karaciğerde tekrarlar. Periton boşluğu ve lenf düğümleri de yaygın rekürrens bölgeleridir. Neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi, sağkalım süresini sadece bir miktar uzatır. Rezeksiyon sonrası rezidü tümör bulgusu olmayan hastalar cerrahi olarak tedavi edilenler içinde en olumlu prognoza sahip olanlardır.

Evre, en önemli prognostik faktördür.

Pankreasla sınırlı ve en büyük boyutu 3 cm'den küçük karsinomu olan hastalarda sağkalım süresi, karsinomu pankreasın dışına uzanan ve boyutu 3 cm'den büyük olan hastalardan daha uzundur. En son evreleme sistemine de yansıtıldığı gibi boyut, pankreas dışına uzanımdan daha önemlidir.

Lenf nodu metastazları prognozu büyük ölçüde kötüleştirir. Lenf nodu durumu sadece cerrahi rezeksiyon sonrası kısa süreli sağkalımı (<5 yıl) belirlemekle kalmaz, aynı zamanda uzun süreli sağkalımı (≥5 yıl) da öngörür.

Lenf nodu oranı (metastaz barındıran lenf nodu sayısının incelenen toplam lenf nodu sayısına oranı), ameliyat sonrası sağkalımın önemli tahmin unsurudur. Lenf nodu negatif rezeksiyonların uygun evrelemesi için en az 12 lenf nodunun incelenmesi önerilmektedir.

Pankreas gövdesi ve kuyruğunda bulunan tümörler, pankreas başındakilerden daha ileri bir evrede ortaya çıkma eğilimindedir.

Histolojik özellikler evre kadar güçlü prognostik belirleyici değildir.

Tümör derecesi, mitotik indeks, ciddi hücresel atipi rezeksiyon sonrası sağkalımla koreledir. Büyük damar tutulumu, damar invazyonu, perinöral invazyon ve rezeksiyon sınırının durumu da prognostik göstergelerdir. Bildirilen diğer prognostik parametreler arasında CA19-9, obezite, ırk ve metastaz bölgesi (sadece akciğer tutulumu durumunda uygundur) yer alır (29). Ayrıca SMAD4 (DPC4) gen inaktivasyonu daha kötü prognoz ile ilişkilidir (29, 45).

2.4.9- TNM Klasifikasyonu ve Evreleme

TNM klasifikasyonu (AJCC 8. baskıya göre) klinik ve patolojik olarak aşağıda belirtilmiş olup evreleme Tablo 2'de gösterilmiştir.

TNM Klinik Klasifikasyonu

T-Primer Tümör

TX: Primer tümör değerlendirilemez.

T0: Primer tümör bulgusu yok.

Tis: Karsinoma in situ*

T1: Tümörün en büyük çapı ≤ 2 cm

T1a: Tümörün en büyük çapı $\leq 0,5$ cm

T1b: Tümörün en büyük çapı 0,5-1 cm

T1c: Tümörün en büyük çapı 1-2 cm

T2: Tümörün en büyük çapı 2-4 cm

T3: Tümörün en büyük çapı >4 cm

T4: Tümör çölyak eksen, süperior mezenterik arter ve/veya ana hepatik artere invazidir.

*Tis ayrıca PanIN3 sınıflandırmasını da içerir.

N- Bölgesel Lenf Nodları

NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1: 1-3 bölgesel lenf nodu metastazı

N2: ≥ 4 bölgesel lenf nodu metastazı

M- Uzak Metastaz

M0: Uzak metastaz yok.

M1: Uzak metastaz var

pTNM Patolojik Klasifikasyonu

pT ve pN kategorileri T ve N kategorilerine karşılık gelir.

pN0: Bölgesel bir lenfadenektomi örneğinin histolojik incelemesi normalde 12 veya daha fazla lenf nodunu içerecektir. Lenf nodları negatif ancak normal olarak incelenen sayıyı karşılamıyorsa, pN0 olarak sınıflandırılır.

pM- Uzak Metastaz*

pM1 : Uzak metastaz mikroskopik olarak doğrulandı.

*pM0 ve pMX geçerli kategoriler değildir.

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T2	N0	M0
Evre 2A	T3	N0	M0
Evre 2B	T1, T2, T3	N1	M0
Evre 3	T1, T2, T3 T4	N2 Herhangi bir N	M0 M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 2: Pankreatik duktal adenokarsinomlarda evreleme (29).

2.4.10- Pankreatik Duktal Adenokarsinomun Derecelendirmesi

PDAK'ın derecelendirilmesi glandüler farklılaşma, müsin üretimi, mitotik aktivite ve nükleer özelliklerin bir arada değerlendirilmesine dayanır. İntratümöral heterojenite varsa (örneğin diferansiasyon derecesi ve mitotik aktivitede farklılık) daha yüksek olan derece verilir. Bu kural yalnızca küçük bir bileşen (tümörün %50'den azı) daha yüksek derecedeyse de geçerlidir. Bu sistem kullanıldığında, derece ve sağkalım arasında bir korelasyon vardır ve derece bağımsız bir prognostik değişkendir (29).

2.5- İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRTEÇLER

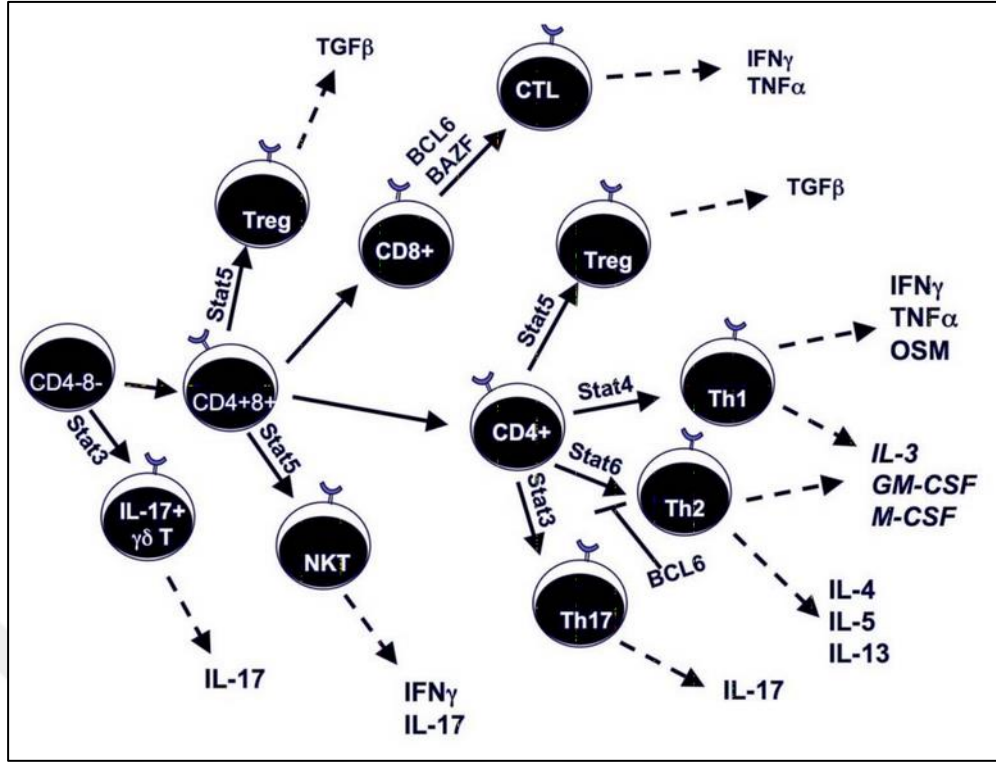
2.5.1- CD4 ve CD8

PDAK'ların yoğun stromal fibrozise sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir ve bu inflamatuvar kabuğun, tümör çevresinde ve içinde, önemli ve spesifik herhangi bir immün tepkiyi önlediği düşünülmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda, bu tümör mikroçevrenin immün yapısının derinlemesine karakterizasyonu daha karmaşık bir tablo ortaya çıkarmıştır. 1998 gibi erken bir dönemde immünohistokimya ile, PDAK'da normal pankreasa kıyasla infiltre olan yoğun bir T hücresi popülasyonu olduğu görülmüştür (8). Bu T hücreleri ayrıca CD4 veya CD8 için pozitif olarak tanımlanmıştır. Bu tümör infiltrasyonu yapan lenfosit popülasyonunun düzenlenmesinin CD4 ve CD8 pozitif hücrelerin oranlarının daha yüksek olduğu hastalarda ilerlemiş prognoz ile klinik korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (9, 10). Daha yeni çalışmalarda, bu T hücrelerin, ağırlıklı olarak antijen bağımlı efektör bellek T hücrelerin veya Treg'lerin ve bu intratümöral proinflamatuvar T hücrelerin, inflamasyonu aktive etme potansiyelini koruduğu görülmüştür. Ayrıca, daha az baskın olmasına rağmen, tümör infiltratlarının, az diferansiye PDAK'larda yoğun makrofajlar gibi myeloid hücreleri de içerdiği gösterilmiştir (53). Bu çalışmalar, PDAK'ın immün infiltratının hem lenfoid hem de myeloid hücre kompleksinden oluştuğunun belirlenmesine yardımcı olmuştur. Baskın immün hücre tiplerine karşı aktive edici göreceli düzenlemenin, tümörün biyolojisi ve prognozu üzerinde önemli bir etkisi olabilir (54).

Tek pozitif CD8+ ve CD4+ T hücreleri timus içinde çift pozitif öncü hücrelerden gelişir (55-57). Pozitif ve negatif seçimi takiben T hücreleri, dalak ve lenf düğümleri gibi ikincil lenfoid organlar arasında yeniden dolaşan olgun naiv T hücreleri olarak periferik salınır. Aynı kökenli antijenleri taşıyan antijen sunan hücreler ile karşılaştıktan sonra naiv T hücreleri, iltihaplı

bölgelere göç eden ve enfekte olmuş hücreleri öldüren çok sayıda efektör hücreye farklılaşır. Antijen klerensinden sonra, bu efektör hücrelerin çoğunluğu (%90-95 kadar) apoptoza maruz kalırken, küçük bir oran hayatta kalır. Uzun vadede devam eden ve sonraki bir karşılaşmadan sonra daha hızlı ve etkili bir şekilde tepki verebilen bellek hücreleri oluşturur (55, 58).

Naiv T hücresi kısmı oldukça homojen olmasına rağmen, vücutta farklı işlevlere, moleküler özelliklere ve lokalizasyona sahip düzinelerce alt kümeyi içeren efektör ve bellek T hücreleri büyük ölçüde çeşitlidir (58, 59). Aslında, bellek T hücrelerin alt kümeleri, uzun vadede hayatta kalma, vücutta göç etme (ikincil lenfoid organlar ve periferik dokular) ve bu tür dokularda stabil bir şekilde bekleme (yani doku rezidansı) gibi farklı kapasiteleri ile karakterize edilir. Bu özelliklere göre ayrılmaya ek olarak, CD4+ T hücreler ve bir dereceye kadar CD8+ T hücreler, çeşitli efektör alt kümelere; örneğin T helper 1 (Th1), Th2, Th17 veya düzenleyici alt kümelere; örneğin düzenleyici T hücrelere (Treg'ler) ve lokal olarak bulunan sitokinler ve metabolitler gibi çözünür aracılara bağlı olarak tip 1 düzenleyici (Tr1) hücrelere farklılaşır (58, 60). Stimülasyonun ardından, bu Th alt grupları Th1 için IFN γ , Th2 için interlekin-4 (IL-4) ve Th17 hücreleri için IL-17 dahil olmak üzere prototipik efektör sitokinler üretir. Bu sitokinler hücre içi virüsler, bakteriler, helmintler ve mantarlar gibi spesifik patojenlerden korunmada rol oynar (61) (Şekil 13).



Şekil 13. T hücrelerin gelişimi ve farklılaşması (62).

2.5.2- Treg'ler ve FOXP3

2.5.2.1- Genel Bilgiler

Treg'ler immün homeostazı korumak için, otoimmünite için, immünopatoloji ve alerjiyi önlemek için gereklidir ve immünosüpresif fonksiyonlarını çoklu mekanizmalar yoluyla uygulayabilir. Bu mekanizmalar immünosüpresif çözünür faktörlerin salgılanması, hedef hücrelerin sitolizi, metabolik bozulma ve dendritik hücrelerin modülasyonunu içerir (59, 63, 64).

Treg'ler ya timustan kaynaklanabilir; doğal Treg'ler (nTreg) olarak gösterilir, ya da periferde üretilir; uyarılmış (indüklenmiş, adaptif) Treg'ler

(iTreg) adı verilir (59, 65, 66) (Tablo 3). nTreg'ler ve iTreg'ler, yüzey belirteci ekspresyonu yönünden oldukça benzerdir, bu da aralarında ayırım yapmayı zorlaştırır (59). Ancak CD80 / CD86 veya CD28'in bulunmaması, periferik lenfoid dokulardaki regülatur hücrelerin sayısında bir azalmaya ve otoimmüniteyi kontrol etmek için gerekli olan nTreg hücrelerin olmaması nedeniyle beklenmedik bir otoimmün alevlenmeye yol açar. Bununla birlikte, nTreg hücrelerin aksine, iTreg hücrelerin gelişimi veya işlevleri için CD28 aracılı bir stimülasyon gerekmebileceği belirtilmektedir (66, 67). iTreg'ler özellikle enfeksiyonlar ve organ transplantasyonu gibi durumlarda periferik toleransın korunmasında nTreg'lere tamamlayıcı bir rol oynar (66, 68). Her iki Treg alt kümesi, hayatta kalmaları için IL-2'ye ihtiyaç duyar. CD25^{hi} ve CD127^{lo} kombinasyonu yaygın olarak insan nTreg'lerini tanımlamak için kullanılır (59).

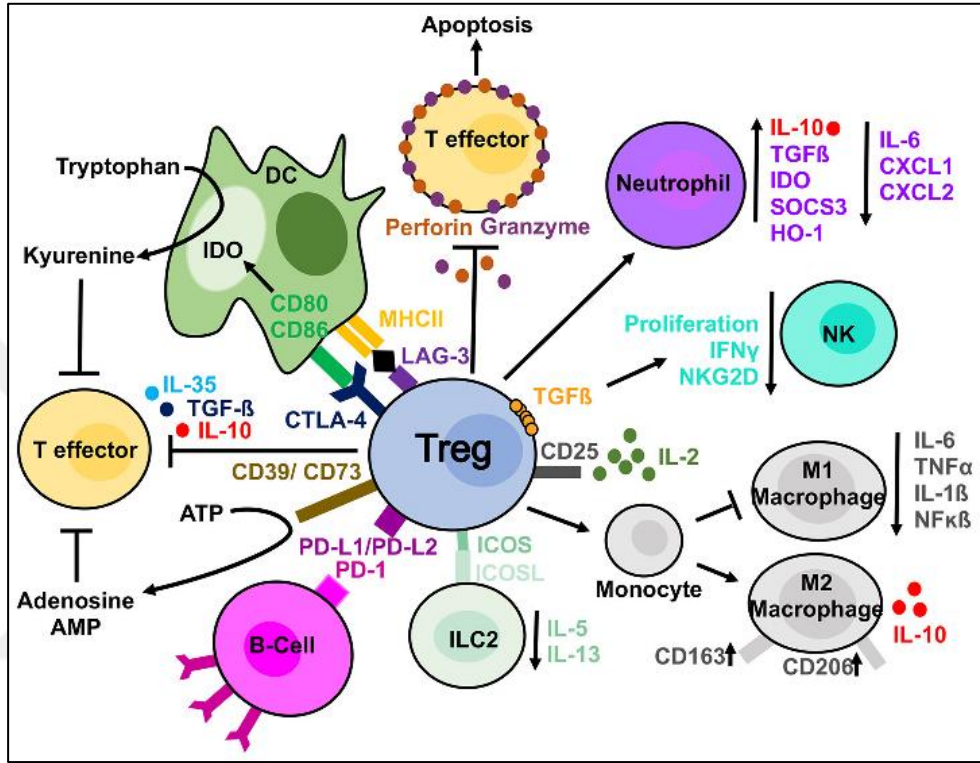
	nTreg	iTreg
Üretim yeri	Timus	Perifer
CD28-CD80/CD86 bağımlı	Evet	Hayır
IL2 bağımlı	Evet	Evet
CD25 ekspresyonu	Evet (yüksek)	Değişken
Özgünlük	Timusta kendi antijenleri	Dokuya özgü antijenler ve yabancı antijenler
Baskılayıcı mekanizma	T hücre-T hücre/APC teması, sitokin bağımlı	T hücre-T hücre/APC teması, sitokin bağımsız

Tablo 3: nTreg'ler ile iTreg'lerin karşılaştırılması (APC: antijen sunan hücre) (66)

Ana transkripsiyon faktörü forkhead box proteini P3 (FOXP3) TGF β varlığında naiv T hücrelerin aktivasyonundan sonra üretilen nTreg'leri karakterize eder (59). Transkripsiyon faktörü FOXP3, forkhead-kanatlı-sarmal transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. Gen ekspresyonunun geniş bir regulatuarı olarak, immünoregulator T hücrelerin en yaygın olarak tanınan ve iyi çalışılan alt kümesinin kimliği ve işlevi için merkezi bir rol oynar (7, 10). Bu nTreg hücreleri, FOXP3'ün ekspresyonu ile tanımlanır, ancak FOXP3 ekspresyonu, aktivasyon üzerine Treg olmayan hücrelerde (iTreg) geçici olarak indüklenebilir. nTreg hücrelerin bir başka tanımlayıcı özelliği, diğer lökositlerin aktivasyonunu ve fonksiyonunu baskılama kabiliyetleridir. Bu yetenek, immün homeostazı korumadaki rollerinin merkezinde yer alır. nTreg hücreleri ayrıca yapısal olarak yüksek CD25 ekspresyonu (interlökin-2 (IL-2) reseptörünün yüksek afinite zinciri olan IL-2Ra olarak da bilinir) ile işaretlenir; CD25, IL-2'yi diğer hücreler kaynaklarının atmalarını sağlar. Treg hücreleri kendi kaynaklarını üretmediği için bu hayatta kalmayı ve yayılmayı teşvik eden sitokini sağlamak önemli bir özelliktir (7, 69).

FOXP3+ Treg hücreleri arasında önemli bir heterojenite vardır ve alt kümeler farklı dokularda ortaya çıkar ve benzersiz fonksiyonel yetenekler sergiler. Genel olarak, FOXP3+ Treg hücreleri bir dizi iyi yapılandırılmış mekanizma yoluyla baskılayıcı işlevler uygular. Örneğin, antiinflamatuvar sitokinleri salgılar (IL10, IL35 ve TGF β), koinhibitör molekülleri eksprese eder (sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (CTLA4) ve lenfosit aktivasyon geni 3 proteini (LAG3)) ve antijen sunan hücrelerin (APC'ler) aktivitesini modüle edebilirler. Perforin ve granzim üreterek direkt hedef hücre zarına zarar verip apoptoza yol açabilirler. nTreg hücreleri ayrıca mikroçevreden önemli büyüme faktörlerini tüketebilir, böylece bunları efektör hücrelerden ayırır ve potansiyel olarak efektör hücreleri "aç bırakarak" onları enerji veya apoptoza götürür. Ayrıca az miktarda aminoasitleri aldıkları ve tükettikleri bilinir ve CD39 ve CD73 ektoenzimlerinin ekspresyonu yoluyla efektör hücre metabolizmasını bozan ve enerjiye yol açan adenosin nükleozidlerinin

birikmesini sağlarlar (7, 70). nTreg'ler ayrıca monositleri M2 makrofaj yönüne farklılaşmaya yönlendirir ve proinflamatuvar M1 makrofajlara farklılaşmalarını önleyebilir. Benzer şekilde nötrofillerde de baskılayıcı fenotipi indükleyebilir (70) (Şekil 14).



Şekil 14. nTreg hücrelerin baskılayıcı mekanizması (70).

Ek olarak, nTreg hücrelerin sitotoksik potansiyel ile donatıldığı bildirilmektedir ve efektör hücreleri basitçe öldürerek baskılayabilirler (7, 64, 70, 71). Bu baskılayıcı fonksiyonların yerine getirilmesi, nTreg hücreleri içindeki genlerin uygun şekilde düzenlenmesini gerektirir ve FOXP3 ekspresyonu, nTreg hücre gen ekspresyonu peyzajının oluşturulması ve sürdürülmesi için çok önemlidir. nTreg hücre altkümeleri ayrıca anjiyogenez (vasküler endotelial büyüme faktörü A ifadesi aracılığıyla), doku onarımı ve hem organizmal düzeyde hem de T hücre seviyesinde metabolik düzenleme dahil olmak üzere birkaç ekstra immün fonksiyona aracılık edebilir (7).

Farelerde ve insanlarda FOXP3 mutasyonunun sonuçları, bu transkripsiyon faktörünün immün homeostazdaki önemini açıkça göstermektedir. FOXP3'te, gende 2 bp'lik bir gen sokmadan kaynaklanan mutasyon taşıyan fareler, kesilmiş bir gen ürünü eksprese eder. Bu farelerdeki nTreg hücreleri baskılayıcı işlevden yoksundur ve T hücrelerin aşırı aktivitesini ve proinflamatuvar sitokin üretimini kısıtlayamazlar (72).

İnsanlarda, FOXP3 geninin mutasyonu tipik olarak ölümcül IPEX (immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçen) sendromuna yol açar. Bu genetik bozukluğu olan hastalar, yaşamın ilk birkaç ayında dermatit, enteropati, diyabet, tiroid bozuklukları (endokrin bezi disfonksiyonu nedeniyle) ve anemi dahil olmak üzere bir dizi immünopatoloji geliştirir (7, 73).

Bu fenotipler iyi belgelendiğinden, FOXP3'ün bir süredir nTreg hücrelerin baskılayıcı işlevi için anahtar olarak görülmesi şaşırtıcı değildir. Buna göre, birçok araştırma çabası, nTreg hücrelerinde FOXP3'ün ifadesini ve işlevini etkilemekten sorumlu faktörleri ve yolları açıklamaya odaklanmıştır. Her ne kadar FOXP3 ekspresyonu diğer hücre tiplerinde bildirilmiş olsa da bunun immün homeostazis ile ilişkisi daha az açıktır (7).

2.5.2.2- Diğer Hücrelerde FOXP3 Ekspresyonu

a. Aktive olmuş CD4+ T hücreleri

FOXP3 ifadesi, nTreg olmayan hücrelerde, özellikle aktivasyondan sonra rapor edilmiştir (74-76). Ek olarak, FOXP3 kodlayan transkriptlerin ve FOXP3 proteinin ekspresyonu, T yardımcı 17 (Th17) hücre yolağının dallanma bölgelerinde ve in vitro iTreg hücre farklılaşmasında geçici olarak erken dönemde görülebilir (75, 76). Yakın zamanda aktive edilmiş T

hücrelerinde FOXP3'ün bir rolü (örneğin, aktivasyonun derecesini azaltmak) olup olmadığı spekülâtiftir. Her şeye rağmen, nTreg olmayan hücrelerde FOXP3 ekspresyonunun kapsamının ve/veya süresinin FOXP3 lokusundaki izin verilenden az epigenetik durumlarla sınırlı olması muhtemeldir (7, 63).

b. CD8+ T hücreleri

Baskılayıcı işlevlere sahip bir dizi CD8+ T hücre popülasyonu tanımlanmıştır (77). Bazıları belirgin FOXP3 ekspresyonu olmadan hem otoimmün hem de antiviral yanıtları zayıflatabilse bile, insan tümörleri dahil olmak üzere bir dizi ortamda CD8+ FOXP3+ T hücreleri de rapor edilmiştir (74, 78, 79). Bununla birlikte, baskılayıcı işlevlere sahip CD8+ T hücrelerinde FOXP3'ün düzenlenmesi ve önemi tam olarak gösterilmeye devam etmektedir. Yaygın olarak CD8+ Treg hücrelerinde FOXP3 seviyelerinin, CD4+ Treg hücrelerinde bulunan seviyelerden çok daha düşük olma eğiliminde olduğu ve bazı çalışmalarda fare CD8+ FOXP3+ T hücrelerin CD4+ Treg hücrelere göre ya hafif baskılayıcı olduğu ya da baskılayıcı fonksiyonunun olmadığı gözlenmiş olup FOXP3'ün CD8+ T hücrelerin baskılayıcı işlevlerini yönlendirmede önemli bir rolü olup olmadığı konusu tamamen açıklığa kavuşmamıştır (7, 63, 80).

c. Natural killer T hücreleri

Doğal öldürücü T hücreleri (NKT hücreleri), CD1d tarafından sunulan lipid antijenlerini tanıyabilen lenfositlerdir. Efektör tipi sitokinler üretmenin yanı sıra, NKT hücrelerin immün toleransa katkıda bulunduğu bilinmektedir (81). A-galaktosilseramid ile tedavi edilen farelerin lenf düğümlerindeki değişmez NKT (iNKT) hücrelerin, TGFβ'ye yanıt olarak FOXP3 ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, insan kanından türetilmiş iNKT hücrelerin, in vitro TGFβ uygulamasının ardından FOXP3'ü ve efektör

sitokinlere karşı nötralize edici antikorları eksprese ettikleri gösterilmiştir (82).

d. Makrofajlar

nTreg hücreleri dışındaki immün hücre tiplerine göre fizyolojik FOXP3 ekspresyonunun derecesi, çoğu için tartışmalı bir nokta olarak kalır. Ancak son zamanlarda FOXP3 ekspresyonu normal makrofajlarda gözlenmese de fare böbrek kanseri tümörlerine sızmış makrofajlarda “western blot” ve ters transkripsiyon PCR ile tespit edilmiştir (83). Bu sonuçlar FOXP3’ün özellikle tümöre infiltre makrofajlarda potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmektedir ve bu tümöre eşlik ettiği bilinen hücreleri terapötik olarak hedefleme olasılığını vurgulamaktadır (7, 83).

e. B hücreler

Baskılayıcı bir fonksiyona sahip B hücreleri karakterize edilmiştir. Bu 'regulatuvar' B hücre popülasyonları genellikle aktivasyon üzerine antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10 veya IL-35) üretimi ile karakterize edilir ve ayrıca bir dizi otoimmün ortamda inflamasyonu sınırlandıran koinhibitör yüzey moleküllerini eksprese ederler (84, 85). Regulatuvar B hücreleri ayrıca tümöre bağlı immün toleransın uygulanmasına ve farelerde kanserin ilerlemesine ve yayılmasına katkıda bulunur (86). İnsanlarda, bazı regulatuvar B hücrelerin de FOXP3 eksprese ettiği bildirilmiştir (87). Multipl sklerozlu ve sistemik lupus eritematozuslu hastalarda bu hücrelerin miktarlarındaki aşırı artışın hastalık aktivitesi ile ilişkili görülmesi, bu artışın inflamatuvar hasarın boyutunu sınırlamak için tepkisel bir önlem olabileceğini düşündürmektedir (88, 89). Bu hastalarda FOXP3’ün regulatuvar B hücrelere kesin katkıları ve regulatuvar B hücresi fonksiyonuna fizyolojik bir katkı olarak

FOXP3'ün önemi, bazı regülatuar B hücreleri belirgin FOXP3 ekspresyonu olmadan iltihabı azalttığı için belirsizliğini korumaktadır (7).

f. Kanser hücreleri

FOXP3 ekspresyonu meme, prostat, pankreas, tiroid, mide ve over kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok malign hücre tipinde gösterilmiştir (90-92). FOXP3'ün bir tümör baskılayıcı gen olduğu ileri sürülmesine rağmen, biyolojik fonksiyonu ve tümör hücrelerindeki rolü tam olarak tanımlanmamış olup çalışmalar devam etmektedir. Ek olarak, FOXP3, malign hücreler üzerindeki doğrudan etkilerinin ötesinde, kanser hücreleri ile tümör mikroçevresi arasında meydana gelen karışım üzerinde önemli ve karmaşık etkilere sahip olabilir. Bu nedenle, kanser hücreleri içindeki FOXP3'ün hücre içi konumunu ve işlevini kontrol eden faktörlerin, farklı tümörde farklı biyolojik aktiviteler ve prognostik kullanımlar sağlayacağı muhtemeldir (7).

3-GEREÇ VE YÖNTEM

3.1- OLGU SEÇİMİ

01.01.2013-31.12.2018 tarihleri arasında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarına gönderilen 59 adet olgunun PDAK tanısı alan rezeksiyon materyalleri yeniden değerlendirildi. 9 adet olgu doku bloğunda materyali yeterli olmadığı için çalışmadan dışlandı. Çalışmaya alınan 50 olgunun gerekli demografik verileri hastane otomasyon sistemi kullanılarak elde edildi. Uygun fiksasyona sahip, takip artefaktı içermeyen ve yeterli tümör alanı içeren birer blok seçildi.

Çalışmaya ait etik kurul kararı Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmış olup, 05.04.2019 tarih ve 2019/153 sayılı karardır.

3.2- HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

Olgulara ait H&E boyalı preperatlar Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı arşivinden temin edildi. Tümör; diferansiasyon derecesi, yerleşim yeri, çap, lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınır (pankreas distal cerrahi sınırı, retroperitoneal sınır, koledok cerrahi sınırı), çevre doku invazyonları (peripankreatik yağ doku, duodenum, ampulla ve koledok) ve patolojik evre (AJCC 8. baskı) açısından patoloji raporu esas alınarak yeniden değerlendirildi. Tümörün diferansiasyon derecesi; iyi, orta, az, yerleşim yeri; baş, gövde ve kuyruk, tümör çapı; $\leq$ ortalama çap, $>$ ortalama çap, patolojik evre; ≤ 2 ve ≥ 3 , lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon,

lenf nodu metastazı, cerrahi sınırdaki tümör ve çevre doku invazyonu; var ve yok olarak değerlendirildi. Cerrahi sınırdaki makroskopik ya da mikroskopik tümör varlığı pozitif kabul edildi.

3.3- İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmünohistokimyasal olarak FOXP3, CD4 ve CD8 antikorları için double boyama yöntemi tercih edildi. Boyama FOXP3-CD4 ve FOXP3-CD8 şeklinde yapıldı. Her iki boyamada da birinci antikor FOXP3, ikinci antikorlar CD4 veya CD8 olacak şekilde uygulandı. Birinci antikor için Bond Polymer Refine Detection (Leica marka, DS9800) kit ile kahverengi (DAB) ve ikinci antikor için Bond Polymer Refine Red Detection (Leica marka, DS9390) kit ile kırmızı (AEC) renk boyanma elde edildi. Her bir antikor pozitif kontrolleriyle birlikte çalışıldı. İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorlar ve yapılan uygulamalar Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4: İmmünohistokimyasal double boyama uygulama prosedürü

Antikorlar	Double Boyama Sırası	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon	Antijen Açığa Çıkarma	Firma
FOXP3	Birinci (DAB)	EP340	1:100	18 Dakika	ER2/30 Dakika	Epitomics
CD4	İkinci (AEC)	4B12	1:75	15 Dakika	ER2/10 Dakika	Novocastra
CD8	İkinci (AEC)	4B11	1:100	15 Dakika	-	Novocastra

Çalışmaya dahil edilen parafin bloklardan adezivli lamlara 1-1,5 µm kalınlığında parafin kesitler alındı. Leica Bondmax immünohistokimya otomatik cihazı ile aşağıdaki işlemler uygulandı.

Birinci Boyama (DAB)

1. Deparafinizasyon işlemi - 30 Dakika (60 °C)
2. Dewax solüsyonu - 0 Dakika (72 °C)
3. Dewax solüsyonu - 0 Dakika (72 °C)
4. Dewax solüsyonu - 0 Dakika
5. Alkol - 0 Dakika
6. Alkol - 0 Dakika
7. Alkol - 0 Dakika
8. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
9. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
10. Yıkama solüsyonu - 5 dakika
11. ER2 solüsyonu - 0 dakika
12. ER2 solüsyonu - 0 dakika
13. ER2 solüsyonu - Antikora göre 30 dakika (100°C)
14. ER2 solüsyonu - 12 dakika

15. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)

16. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)

17. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)

18. Yıkama solüsyonu - 3 dakika

19. Perokside blok - 10 dakika

20. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

21. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

22. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

23. Primer antikor - 18 dakika

24. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

25. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

26. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

27. Postprimer - 7 dakika

28. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

29. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

30. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

31. Polimer - 7 dakika

32. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

33. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

34. Distile su - 0 dakika

35. Mikst diaminobenzidin - 0 dakika

36. Mikst diaminobenzidin - 10 dakika

37. Distile su - 0 dakika

38. Distile su - 0 dakika

39. Distile su - 0 dakika

40. Hematoksilen - 5 dakika

41. Distile su - 0 dakika

42. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

43. Distile su - 0 dakika

İkinci Boyama (AEC)

1. İki kez yıkama solüsyonundan geçirildi. (0 dakika)
2. ER solüsyonu - 0 dakika
3. ER solüsyonu - 0 dakika
4. ER solüsyonu - Antikora göre 10/- dakika (100°C)
5. ER solüsyonu - 12 dakika
6. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)
7. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)
8. Yıkama solüsyonu - 0 dakika (35°C)
9. Yıkama solüsyonu - 3 dakika
10. Primer antikör - 15 dakika
11. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
12. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
13. Yıkama solüsyonu - 0 dakika
14. Postprimer - 18 dakika

15. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

16. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

17. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

18. Polimer - 25 dakika

19. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

20. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

21. Yıkama solüsyonu - 5 dakika

22. Yıkama solüsyonu - 2 dakika

23. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

24. Distile su - 0 dakika

25. Mikst red refine - 10 dakika

26. Mikst red refine - 5 dakika

27. Distile su - 0 dakika

28. Distile su - 0 dakika

29. Distile su - 0 dakika

30. Hematoksilen - 5 dakika

31. Distile su - 0 dakika

32. Yıkama solüsyonu - 0 dakika

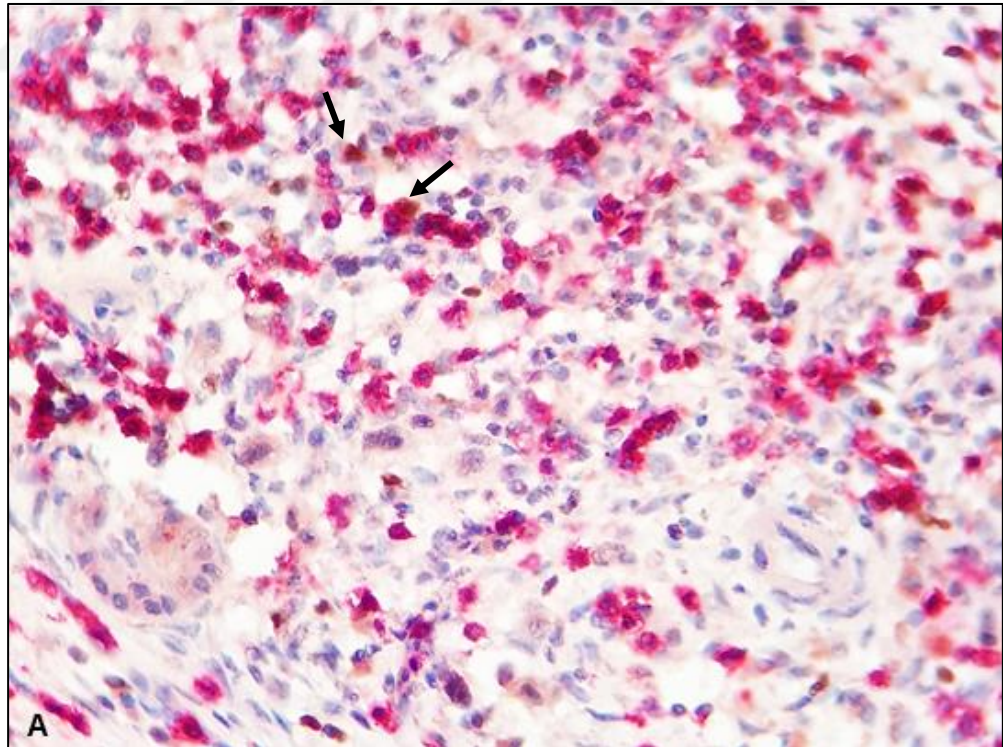
33. Distile su - 0 dakika

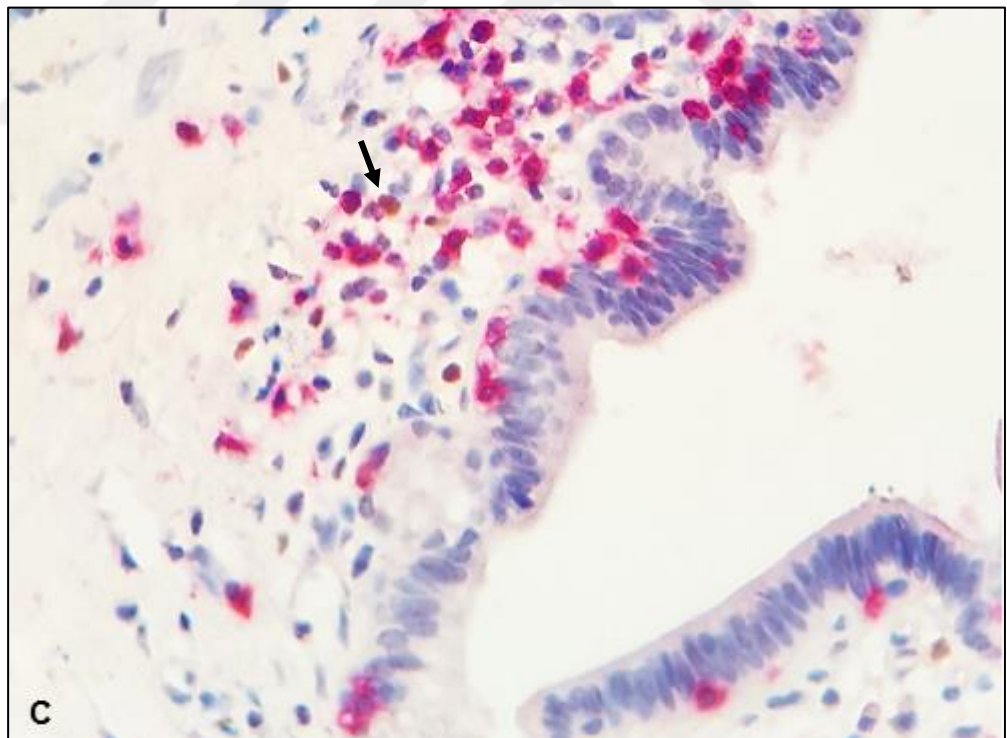
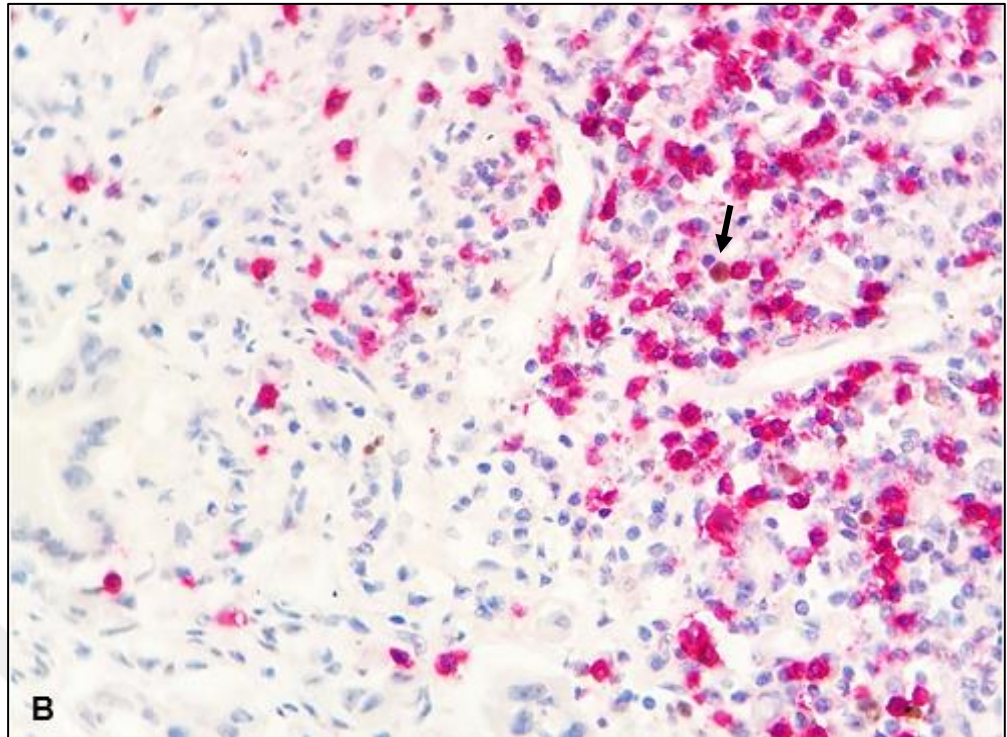


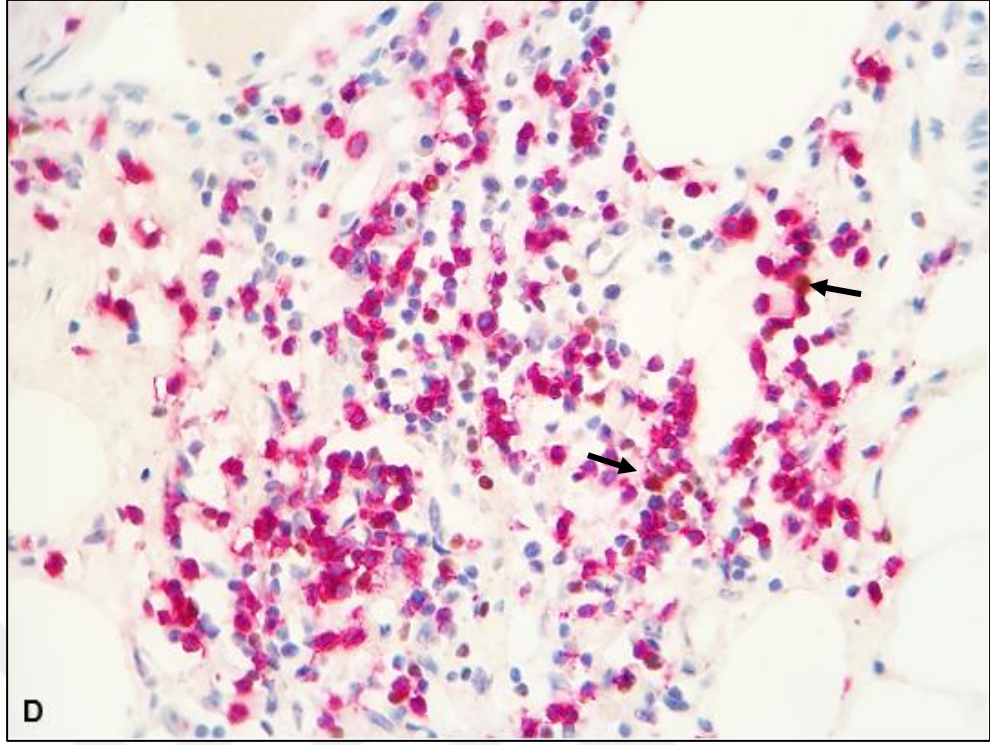
3.4- İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

İmmünohistokimyasal olarak double boyama yöntemiyle hazırlanan FOXP3-CD4 ve FOXP3-CD8 boyalı preparatlar binoküler mikroskopta (Nikon ECLİPSE Ni-U) önce küçük büyütmede (x40) tarandı. Daha sonra boyanmanın en yoğun olduğu alanlar büyük büyütmede (x400) değerlendirildi. FOXP3 için kahverengi nükleer boyanma (93), CD4 ve CD8 için kırmızı sitoplazmik-membranöz boyanma (94, 95), double ekspresyon için kırmızı-kahverengi boyanma (96) pozitif kabul edildi.

CD8 ve FOXP3 değerlendirilirken Minoru Miyashita, Hironobu Sasano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar örnek alındı. Büyük büyütmede dört alanda CD8+ hücreler, FOXP3+ hücreler ve CD8+ FOXP3+ hücreler sayılarak ortalamaları alındı (97, 98) (Şekil 15).

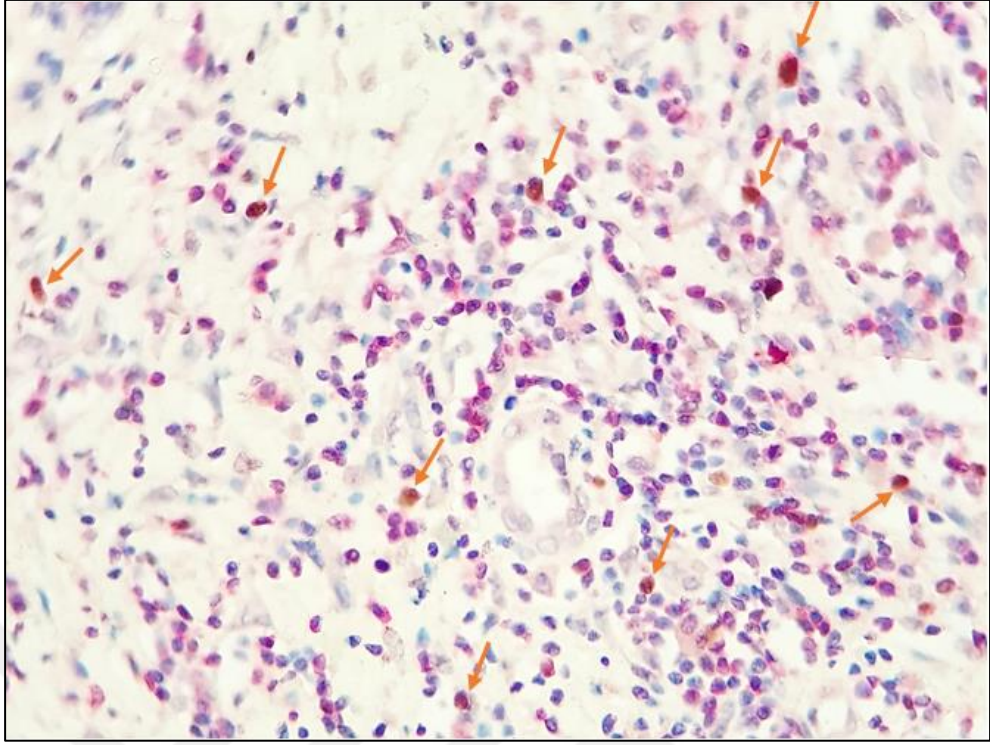






Şekil 15. CD8 ve FOXP3 double boyama. A-D: Kırmızı boyanan CD8+ T lenfositler, kahverengi boyanan FOXP3+ hücreler ve arada CD8+ FOXP3+ double boyanan hücreler (siyah ok) (400X).

CD4 ve FOXP3 değerlendirilirken Tamara Vorobjova, Oivi Uibo ve arkadaşlarının yaptığı çalışma örnek alındı. Büyük büyütmede dört alanda CD4+ hücreler, FOXP3+ hücreler ve CD4+ FOXP3+ hücreler sayılarak ortalamaları alındı (99) (Şekil 16).



Şekil 16. CD4 ve FOXP3 double boyama. Kırmızı boyanan CD4+ T lenfositlerin arasında CD4+ FOXP3+ double boyanan hücreler (turuncu oklar) (X400).

FOXP3+ hücrelerin istatistiksel değerlendirmesi için her iki uygulamada değerlendirilen toplam FOXP3+ hücre miktarının ortalaması hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirmede bu veriler ve bu verilerden elde edilen oranlar kullanıldı.

3.5- İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen veriler tanımlayıcı istatistikler (aritmetik ortalama, ortanca, standart sapma, yüzde dağılımlar) ile değerlendirildi. Parametrik verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafiksel incelemeler ile sınıandı. İki bağımsız grubun ortalamasının karşılaştırılması normal dağılım gösteren veriler için Student T testi, normal dağılım göstermeyen veriler için Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin gruplar arası yüzde dağılımları Ki-Kare testi, Ki-Kare koşulları sağlanamadığında Fisher's Exact testi ile, birden fazla sürekli verinin korelasyonu Spearman testi ile değerlendirildi. İki veya daha fazla grubun ortalamasının karşılaştırılmasında parametrik veriler için tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), parametrik olmayan veriler için Kruskal Wallis testi uygulandı. Sonucun anlamlı olması durumunda farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Verilerin analizinde SPSS v20 programı kullanıldı ve $p < 0,05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

4-BULGULAR

Çalışmamızdaki 50 hastanın 24'ü (%48) erkek, 26'sı (%52) kadındı.

Hastaların yaş ortalaması $69,54 \pm 10,33$ (48-89 aralığında)'tı.

Çalışmamızdaki PDAK vakalarının 46'sı (%92) baş, 1'i (%2) gövde ve 3'ü (%6) kuyruk yerleşimliydi.

Vakalara ait materyallerin makroskopik değerlendirmesinde, tümörlerin en küçüğü 0,4 cm, en büyüğü 10 cm çapa sahip olup ortalama tümör çapı $3,85 \pm 1,68$ cm'dir. Tümörün en büyük çapı vakaların 28 (%56)'inde ortalamanın altında, 22 (%44)'sinde ortalamanın üstünde saptanmıştır (Tablo 5). Baş yerleşimli tümörler ortalama $3,65 \pm 1,58$ cm çapa sahipken gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler ortalama $6,08 \pm 1,31$ cm çapındadır.

Çalışmaya dahil edilen 50 PDAK vakasının 19'u (%38) iyi diferansiye, 24'ü (%48) orta derecede diferansiye, 7'si (%14) az diferansiye olarak izlendi.

Vakaların 1'i (%2) evre IA, 13'ü (%26) evre 1B, 3'ü evre 2A (%6), 19'u (%38) evre 2B, 10'u (20) evre 3, 4'ü (%8) evre 4 olarak izlendi.

Vakaların 24'ünde (%48) lenfovasküler invazyon izlenmezken 26'sında (%52) lenfovasküler invazyon izlendi.

Vakaların 17'sinde (%34) perinöral invazyon izlenmezken 33'ünde (%66) perinöral invazyon izlendi.

Vakaların 17'sinde (%34) lenf nodu tutulumu izlenmezken 33'ünde (%66) lenf nodu tutulumu izlendi.

Vakaların 26'sında (%52) cerrahi sınırlarda tümör izlenmemişken, 24'ünde (%48) cerrahi sınırlarda tümör saptanmıştır (Tablo 5). 24 vakanın 18'inde (%75) retroperitoneal cerrahi sınırda, 2'sinde (%8,33) pankreas distal cerrahi sınırında, 2'sinde (%8,33) hem pankreas distal cerrahi sınırında hem retroperitoneal cerrahi sınırda, 2'sinde (%8,33) hem koledok cerrahi sınırında hem retroperitoneal cerrahi sınırda tümör izlenmiştir.

Vakaların 10'unda (%20) çevre doku invazyonu izlenmemiş olup 40'ında (%80) çevre doku invazyonu mevcuttur. 40 vakanın 6'sında (%15) sadece peripankreatik yağlı doku invazyonu, 6'sında (%15) sadece duodenum invazyonu, 6'sında (%15) sadece ampulla invazyonu, 2'sinde (%5) sadece koledok invazyonu izlenmiş olup 20'sinde (%50) birden fazla doku invazyonu bir arada görülmüştür (Tablo 5).

Tablo 5: Vakaların tanımlayıcı özellikleri

Cinsiyet	N	%
Erkek	24	48
Kadın	26	52
Yaş	Min-Max	ORT±SS
	48-89	69,54±10,33
Lokalizasyon	N	%
Baş	46	92
Gövde	1	2
Kuyruk	3	6
Tümör Çapı (cm)	Min-Max	ORT±SS
	0,4-10	3,85±1,68
Diferansiasyon	N	%
İyi	19	38
Orta	24	48
Az	7	14

Evre	N	%
IA	1	2
IB	13	26
IIA	3	6
IIB	19	38
III	10	20
IV	4	8
Lenfovasküler İnvazyon	N	%
Yok	24	48
Var	26	52
Perinöral İnvazyon	N	%
Yok	17	34
Var	33	66
Lenf Nodu Tutulumu	N	%
Yok	17	34
Var	33	66
Cerrahi Sınırdaki Tümör	N	%
Yok	26	52
Var	24	48
Çevre Doku İnvazyonu	N	%
Yok	10	20
Var	40	80

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların tümör çapı ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların tümör çapı arasında anlamlı bir fark görülmedi. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 6).

Tablo 6: Tümör çapı ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

		Tümör Çapı				
		≤3,85 cm		>3,85 cm		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		1,13-30,12	9,98±7,41	0,75-23,38	9,20±5,58	0,992
ortCD8FOXP3		0,00-2,00	0,44±0,55	0,00-5,25	0,53±1,16	0,402
ortCD4FOXP3		2,00-41,00	11,30±8,48	1,00-24,00	11,92±7,36	0,660
CD4/CD8		0,39-1,68	0,94±0,38	0,44-1,78	0,91±0,32	0,779
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	11	39,3	12	54,5	0,283
	var	17	60,7	10	45,5	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	28	100	22	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından “p” değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK’ların diferansiasyon derecesi ile FOXP3+ hücrelerin miktarı arasında Kruskal Wallis testinde anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$, $p=0,034$). Bonferroni düzeltmesi ile farkın iyi diferansiye ve orta derecede diferansiye tümörler arasında olduğu görüldü ($p<0,05/3$, $p=0,015$). CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığı ile diferansiasyon derecesi arasında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$, $p=0,016$) görülmüş olup CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığı iyi diferansiyeden az diferansiyeye doğru artmaktaydı. Ancak PDAK’ların CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı ile yapılan değerlendirmede hücrelerin miktarı iyi diferansiyeden az diferansiyeye doğru artmakla birlikte diferansiasyon derecesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. PDAK’ların diferansiasyon derecesi ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı ve CD4+/CD8+ T hücre oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ancak CD4+ FOXP3+ hücre miktarının iyi diferansiyeden az diferansiyeye doğru artma eğiliminde olduğu görüldü. Bu durum daha fazla vaka sayısı ile yapılan çalışmalarda diferansiasyon

derecesi ile CD8+ FOXP3+ hücre miktarı ya da CD4+ FOXP3+ hücre miktarı arasında anlamlı bir fark elde edilebileceğini düşündürmüştür. İncelenen tüm gruplarda FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 7).

Tablo 7: Diferansiasyon derecesi ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

Diferansiasyon Derecesi								
		İyi		Orta		Az		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		0,75-23,88	6,85±4,94	1,13-30,13	11,06±6,99	4,58-23,38	12,30±7,47	0,034**
ortCD8FOXP3		0,00-2,00	0,36±0,60	0,00-1,75	0,40±0,54	0,25-5,25	1,11±1,84	0,103
ortCD4FOXP3		1,00-21,75	8,32±5,54	2,00-41,00	13,69±8,62	4,75-25,50	13,17±9,09	0,056
CD4/CD8		0,44-1,78	0,90±0,33	0,56-1,69	0,99±0,37	0,39-1,30	0,93±0,35	0,476
CD8FOXP3		N	%	N	%	N	%	p
	yok	12	63,2	11	45,8	0	0,0	0,016***
	var	7	36,8	13	54,2	7	100	
CD4FOXP3		N	%	N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	0	0	*
	var	19	100	24	100	7	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından “p” değeri hesaplanamadı.

**Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. İyi-orta derecede diferansiye gruplar için p=0,015, iyi-az diferansiye gruplar için p=0,078, orta-az diferansiye gruplar için p=0,759 olarak hesaplanmıştır.

***Ki-Kare testinde beklenen değerlerin %20’den fazlası (%33,3) 5’in altında olduğu için Fisher’s Exact testi uygulandı.

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların patolojik evresi ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların patolojik evresi arasında anlamlı bir fark görölmedi. Ancak CD8+ FOXP3+ hücre varlığının, CD4+ FOXP3+ hücre miktarının ve CD4+/CD8+ hücre oranının ileri evre tümörlerde artmakta olduğu görölldü. Bu durum daha fazla vaka ile yapılan çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilebileceğini düşündürdü. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görölldü (Tablo 8).

Tablo 8: Tümör evresi ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

		Evre				
		≤2		≥3		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		0,75-30,13	9,68±6,86	2,88-23,88	9,52±6,19	0,897
ortCD8FOXP3		0,00-5,25	0,48±0,95	0,00-2,00	0,48±0,62	0,493
ortCD4FOXP3		1,00-41,00	11,49±8,45	3,75-25,50	11,79±6,66	0,658
CD4/CD8		0,39-1,69	0,90±0,35	0,48-1,78	0,99±0,37	0,379
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	18	50,0	5	35,7	0,363
	var	18	50,0	9	64,3	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	36	100	14	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından "p" değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların lenfovasküler invazyon durumu ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların lenfovasküler invazyon durumu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 9).

Tablo 9: Lenfovasküler invazyon ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

Lenfovasküler İnvazyon						
		Hayır		Evet		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		1,13-30,13	10,50±6,79	0,75-23,88	8,84±6,48	0,207
ortCD8FOXP3		0,00-1,75	0,42±0,51	0,00-5,25	0,54±1,10	0,485
ortCD4FOXP3		2,00-41,00	12,92±8,59	1,00-25,50	10,33±7,21	0,281
CD4/CD8		0,39-1,57	0,93±0,31	0,44-1,78	0,92±0,39	0,929
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	9	37,5	14	53,8	0,247
	var	15	62,5	12	46,2	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	24	100	26	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından "p" değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların perinöral invazyon durumu ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların perinöral invazyon durumu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Ancak perinöral invazyon olan vakalarda CD8+ FOXP3+ hücre

miktarının/varlığının ve CD4+ FOXP3+ hücre miktarının artma eğiliminde olduğu görüldü. Bu durum daha fazla vaka ile yapılan çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilebileceğini düşündürdü. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 10).

Tablo 10: Perinöral invazyon ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

		Perinöral İnvazyon				
		Hayır		Evet		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		1,13-15,75	8,90±3,97	0,75-30,13	10,01±7,66	0,660
ortCD8FOXP3		0,00-2,00	0,46±0,63	0,00-5,25	0,49±0,97	0,905
ortCD4FOXP3		2,00-22,75	11,37±5,89	1,00-41,00	11,68±8,88	0,539
CD4/CD8		0,62-1,57	0,97±0,31	0,39-1,78	0,91±0,37	0,533
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	8	47,1	15	45,5	0,914
	var	9	52,9	18	54,5	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	17	100	33	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından “p” değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK’ların lenf nodu tutulumu ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK’ların lenf nodu tutulumu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Ancak lenf nodu tutulumu olan vakalarda CD8+ FOXP3+ hücre miktarının/varlığının ve CD4+/CD8+ T hücre oranının artmakta olduğu görüldü. Bu durum daha fazla vaka ile yapılan çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilebileceğini

düşündürdü. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 11).

Tablo 11: Lenf nodu tutulumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

		Lenf Nodu Tutulumu				
		Hayır		Evet		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		4,13-30,13	11,60±7,81	0,75-23,88	8,62±5,78	0,170
ortCD8FOXP3		0,00-1,75	0,32±0,51	0,00-5,25	0,56±0,99	0,423
ortCD4FOXP3		4,25-41,00	13,75±8,99	1,00-25,50	10,45±7,21	0,087
CD4/CD8		0,39-1,66	0,88±0,32	0,44-1,78	0,95±0,37	0,530
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	9	52,9	14	42,4	0,480
	var	8	47,1	19	57,6	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	17	100	33	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından "p" değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların cerrahi sınır tümör durumu ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların cerrahi sınır tümör durumu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 12).

Tablo 12: Cerrahi sınır tümör durumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

Cerrahi Sınırdaki Tümör						
		Yok		Var		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		1,13-23,38	9,27±5,13	0,75-30,13	10,03±8,02	0,705
ortCD8FOXP3		0,00-1,50	0,41±0,50	0,00-5,25	0,55±1,14	0,659
ortCD4FOXP3		2,00-24,00	11,85±7,18	1,00-41,00	11,28±8,82	0,662
CD4/CD8		0,39-1,51	0,91±0,29	0,44-1,78	0,95±0,42	0,642
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	11	42,3	12	50	
	var	15	57,7	12	50	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	
	var	26	100	24	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından "p" değeri hesaplanamadı.

Yapılan değerlendirmede PDAK'ların çevre doku invazyonu durumu ile FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD8+ FOXP3+ hücreler ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Aynı şekilde CD4+/CD8+ T hücre oranı ile de PDAK'ların çevre doku invazyonu durumu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Ancak çevre doku invazyonu olan vakalarda CD8+ FOXP3+ hücre miktarının/varlığının artmakta olduğu görüldü. Bu durum daha fazla vaka ile yapılan çalışmalarda anlamlı sonuç elde edilebileceğini düşündürdü. Her iki grupta da FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olduğu görüldü (Tablo 13).

Tablo 13: Çevre doku invazyonu durumu ile pozitif boyanma özelliklerinin karşılaştırılması

Çevre Doku İnvazyonu						
		Yok		Var		p
		Min-Max	ORT±SS	Min-Max	ORT±SS	
ortFOXP3		4,58-27,00	9,82±6,93	0,75-30,13	9,59±6,62	0,961
ortCD8FOXP3		0,00-1,00	0,25±0,35	0,00-5,25	0,54±0,95	0,481
ortCD4FOXP3		4,75-41,00	13,86±10,99	1,00-25,50	11,00±7,04	0,645
CD4/CD8		0,39-1,35	0,96±0,32	0,44-1,78	0,92±0,36	0,719
CD8FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	5	50	18	45	1,000
	var	5	50	22	55	
CD4FOXP3		N	%	N	%	p
	yok	0	0	0	0	*
	var	10	100	40	100	

*CD4+ FOXP3+ hücre olmayan grup bulunmadığından “p” değeri hesaplanamadı.

İmmünohistokimyasal pozitif boyanma miktarlarının birbirleriyle olan korelasyonları değerlendirildiğinde ise FOXP3+ hücre miktarı ile CD8+FOXP3+ hücre miktarı arasında orta düzeyli ($p=0,003$, $r=0,411$) doğrusal bir korelasyon varlığı saptandı. Aynı şekilde FOXP3+ hücre miktarı ile CD4+FOXP3+ hücre miktarı arasında yüksek düzeyli ($p=0,000$, $r=0,866$) doğrusal bir korelasyon varlığı saptandı. Bu durum tüm prognostik parametrelerin değerlendirmesinde FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olmasını destekler niteliktedir (Tablo 14).

CD4+/CD8+ T hücre oranı ile diğerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Tablo 14).

Tablo 14: Pozitif boyanma miktarlarının korelasyon analizi

		FOXP3	CD8FOXP3	CD4FOXP3	CD4/CD8
FOXP3	r	1,000			
	p	-			
CD8FOXP3	r	0,411	1,000		
	p	0,003	-		
CD4FOXP3	r	0,866	0,149	1,000	
	p	0,000	0,302	-	
CD4/CD8	r	0,098	-0,198	0,066	1,000
	p	0,498	0,168	0,647	-

5-TARTIŞMA

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), bazı bölgelerde kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olduğu tahmin edilen, artan insidansa sahip ölümcül bir durumdur (19, 20). Genellikle ileri evrede ortaya çıkar ve bu da beş yıllık sağkalım oranlarının %2-9 olmasına sebep olur. PDAK, tüm pankreas malignitelerinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (21). Dünyada en yaygın 14. kanser ve kanser ölümlerinin en yüksek 7. nedeni olarak sıralanmaktadır (22). En yüksek standardize yaş insidansı Avrupa ve Kuzey Amerika'da, en düşük standardize yaş insidansı Afrika ve Güney Orta Asya'dadır (23). Gelişmiş ülkelerde hem erkeklerde hem kadınlarda PDAK daha yüksek oranda görülmektedir (24). Ülkeler arasında PDAK insidansındaki büyük farklılıklar, çevresel faktörlerin hastalık için risk faktörleri olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (20). Olguların %80'i 60-80 yaşları arasındadır. 40 yaşın altında çok nadir görülür. Daha genç yaşta ortaya çıkan PDAK erkeklerde kadınlardan 3 kat daha fazla görülürken, ileri yaşlarda kadın erkek arasındaki fark ortadan kalkar ve görülme oranları eşitlenir (48).

Çalışmamızdaki 50 hastanın 24'ü (%48) erkek, 26'sı (%52) kadındı. Hastaların yaş ortalaması $69,54 \pm 10,334$ olup hastalar 48-89 yaş aralığındaydı. Bizim çalışmamızda PDAK için kadın erkek oranı ve ortalama görülme yaşı literatüre benzer görünümündedir.

PDAK hastaların üçte ikisinde pankreas başında, diğer üçte birinde ise gövde veya kuyruk bölgesinde yer almaktadır (29, 45). Pankreas gövdesi ve kuyruğunda bulunan tümörler, pankreas başındakilerden daha ileri bir evrede ortaya çıkma eğilimindedir. PDAK'ın çoğu tektir, fakat nadiren multifokal hastalık da meydana gelebilir (29).

Çalışmamızda PDAK'ların 46'sı (%92) baş, 1'i (%2) gövde ve 3'ü (%6) kuyruk yerleşimliydi. Bizim çalışmamızda da PDAK'ların çoğu baş yerleşimli olup literatüre benzer görünümündedir.

Pankreas başı yerleşimli tümörler 1,5-5 cm çapında olmasına karşın gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler genellikle daha büyüktür (45, 46). En son evreleme sistemine de yansıtıldığı gibi boyut, pankreas dışına uzanımdan daha önemlidir (29).

Çalışmamızdaki vakalara ait materyallerin makroskopik değerlendirmesinde, tümörlerin en küçüğü 0,4 cm, en büyüğü 10 cm çapa sahip olup ortalama tümör çapı $3,85 \pm 1,68$ cm'dir. Tümörün en büyük çapı vakaların 28'inde (%56) ortalamanın altında, 22'sinde (%44) ortalamanın üstünde saptanmıştır. Baş yerleşimli tümörler ortalama $3,65 \pm 1,58$ cm çapa sahipken gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler ortalama $6,08 \pm 1,31$ cm çapındadır. Literatüre benzer şekilde bizim çalışmamızda da gövde ve kuyruk yerleşimli tümörlerin ortalama çapı baş yerleşimli tümörlerin ortalama çapından daha büyüktür.

PDAK'lar farklılaşma derecesine göre, grade 1 (iyi diferansiye), grade 2 (orta derecede diferansiye), grade 3 (az diferansiye) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. PDAK'ların çoğu iyi-orta derecede diferansiyedir. PDAK'ın derecelendirilmesi glandüler farklılaşma, müsin üretimi, mitotik aktivite ve nükleer özelliklerin bir arada değerlendirilmesine dayanır. İntratümöral heterojenite varsa (örneğin diferansiasyon derecesi ve mitotik aktivitede farklılık) daha yüksek olan derece verilir. Bu kural yalnızca küçük bir bileşen (tümörün %50'den azı) daha yüksek derecedeyse de geçerlidir. Bu sistem kullanıldığında, derece ve sağkalım arasında bir korelasyon vardır ve derece bağımsız bir prognostik değişkendir (29).

Çalışmaya dahil edilen 50 PDAK vakasının 19'u (%38) iyi diferansiye, 24'ü (%48) orta derecede diferansiye, 7'si (%14) az diferansiye olarak izlendi. Literatüre benzer şekilde bizim PDAK vakalarımızın da çoğunu iyi-orta derece diferansiye tümörler oluşturmaktadır.

Çalışmamızdaki 50 vakanın 26'sında (%52) lenfovasküler invazyon izlenmiştir. Literatürde PDAK'larda izlenen lenfovasküler invazyon oranının %50-75 olduğu belirtilmektedir. Hideo Takahashi, Eriko Katsuta, Li Yan ve arkadaşları PDAK'lar üzerine yaptıkları 130 vaka içeren çalışmada vakaların %65,4'ünde lenfovasküler invazyon saptamışlardır (100). Jordan M. Winter, John L. Cameron, Kurtis A. Campbell ve arkadaşları PDAK'lar üzerine 1453 vaka ile yaptıkları çalışmada vakaların %53'ünde lenfovasküler invazyon tespit etmişlerdir (101). Bu çalışmalardaki lenfovasküler invazyon oranları ile bizim vakalarımızda izlediğimiz lenfovasküler invazyon oranı benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızdaki 50 vakanın 33'ünde (%66) perinöral invazyon izlenmiştir. PDAK'un yaygın fakat spesifik olmayan bir özelliği olan perinöral invazyon, PDAK için önemli bir prognostik faktördür. Ayrıca, kanser daha az differansiye oldukça perinöral invazyon artar (102). Literatürde PDAK'larda izlenen perinöral invazyon oranının %75-100 olduğu belirtilmektedir (103). Ichiro Hirai, Wataru Kimura, Koichiro Ozawa ve arkadaşları 24 vaka ile PDAK'larda perinöral invazyon durumu üzerine yaptıkları çalışmada vakaların %70,8'inde perinöral invazyon saptamışlardır (104). Han Liu, Qingyong Ma, Qinhong Xu ve arkadaşları 61 vaka ile yaptıkları çalışmada %86,9'unda perinöral invazyon görmüşlerdir (103, 105). Rosalie A Carr, Alexandra M Roch, Xin Zhong ve arkadaşları 52 PDAK vakası ile yaptıkları çalışmada vakaların %82,7'sinde perinöral invazyon tespit etmişlerdir (106). Jordan M. Winter, John L. Cameron, Kurtis A. Campbell ve arkadaşları PDAK'lar üzerine 1453 vaka ile yaptıkları çalışmada perinöral invazyon oranını %91 olarak saptamışlardır (101). Bizim çalışmamızdaki perinöral

invazyon oranı literatürde bildirilen oranlara yakın olmakla beraber bu oranların altındadır. Bu durum bizim çalışmamızda yer alan az diferansiye PDAK oranının yapılan çalışmalardaki az diferansiye PDAK oranının altında olmasıyla açıklanabilir. Vaka sayısı artırıldığında literatür ile daha uyumlu sonuç elde edilebilir.

Rezektabilite, prognozun en önemli belirleyicisidir. Bununla birlikte, cerrahi olarak rezeke edilen karsinomların %70-90'ı, ameliyattan sonraki 2 yıl içinde en yaygın olarak pankreas yatağında ve daha uzaktaki karaciğerde tekrarlar. Periton boşluğu ve lenf düğümleri de yaygın rekürrens bölgeleridir. Neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi, sağkalım süresini sadece bir miktar uzatır. Rezeksiyon sonrası rezidü tümör bulgusu olmayan hastalar cerrahi olarak tedavi edilenler içinde en olumlu prognoza sahip olanlardır (29).

Çalışmamızdaki 50 vakanın 24'ünde (%48) cerrahi sınırlarda tümör saptanmıştır. Literatürde PDAK'ların cerrahi sınır pozitiflik oranları %20'nin altından %80'in üzerine kadar değişkendir. Bu durum pankreas cerrahi rezeksiyon örneklerinde ve özellikle pankreatoduodenektomi sonrasındaki sınır değerlendirmesinin hemen hemen her yönüyle ilgili var olan yaklaşım farklılıklarından kaynaklanabilir (107). Charles C Hsu, Joseph M Herman, Michele M Corsini ve arkadaşlarının PDAK'lar üzerinde 509 vaka ile yaptıkları çalışmada vakaların %44'ünde cerrahi sınırda tümör izlenmiştir (108). Jennifer L Gnerlich, Samuel R Luka, Anjali D Deshpande ve arkadaşlarının PDAK'lar üzerinde 285 vaka ile yaptıkları çalışmada vakaların %34'ünde cerrahi sınırda tümör izlenmiştir (109). Bu çalışmalardaki cerrahi sınır pozitiflik oranları ile bizim vakalarımızda izlediğimiz oran benzerlik göstermektedir.

AJCC 7. baskıya göre T evresi, erken evrelerde tümör boyutuna göre verilirken (pT1: ≤ 2 cm; pT2: >2 cm), pT3 evresi için tümörün pankreas dışına yayılımı (peripankreatik yumuşak doku yayılımı, ekstrapankreatik ortak safra kanalı tutulumu veya duodenuma invazyon) gerekmekteydi (110). Bu durum Burcu Saka, Serdar Balci, Olca Basturk ve arkadaşlarının PDAK'da tümör evrelemesi ile ilgili 223 vaka ile yaptıkları çalışma sonucu önerdikleri evreleme sisteminin AJCC 8. baskıda yer almasıyla değişmiştir. Bu sisteme göre (pT1: ≤ 2 cm, pT2: 2-4cm, pT3: >4 cm, pT4: Tümör çölyak eksen, süperior mezenterik arter ve/veya ana hepatik artere invaze) tümörün pankreas dışına yayılımının evrelemede yeri yoktur (29, 111). Yine aynı çalışmada 223 vakanın %91'inde PDAK çevre doku invazyonu tespit edilmiştir (111). Bizim çalışmamızda 50 vakanın 40'ında (%80) çevre doku invazyonu izlenmiştir. Bu oran, Burcu Saka, Serdar Balci, Olca Basturk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadaki orana göre düşük olmakla birlikte çalışmamızdaki vaka sayımız arttığında benzer oranlar elde edilebilir.

Çalışmamızda PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücre miktarı ile tümörlerin çapı, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumları arasında anlamlı bir fark izlenmedi ancak tümörlerin diferansiasyon derecesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi. Bu fark bizim çalışmamızda daha ziyade iyi diferansiye ve orta derece diferansiye gruplar arasında izlendi. Diferansiasyon derecesi iyi diferansiyeden orta derecede diferansiyeye doğru gittikçe izlenen FOXP3+ hücre miktarının arttığı görüldü. Yongjian Jiang, Zunguo Du, Feng Yang ve arkadaşları 50 vaka ile yaptıkları çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücre miktarı ile tümörlerin çapı, evresi ve çevre doku invazyon durumu ile ilişkisinin olmadığı ancak diferansiasyon derecesi ve bizim çalışmamızın aksine lenf nodu metastazı ile ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir (112). Angela Diana, Lai

Mun Wang, Zenobia D'Costa ve arkadaşları 143 vaka ile yaptıkları çalışmada PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücre miktarı ile tümör çapı, diferansiasyon derecesi, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumu arasında ilişki olmadığını belirtmişlerdir (113). Bu bulgular diferansiasyon derecesi dışında bizim çalışmamızdakine benzerdir. Martin Wartenberg, Inti Zlobec, Aurel Perren ve arkadaşları 120 vaka ile yaptıkları çalışmada tümör mikroçevresindeki FOXP3 miktarı ile lenfovasküler invazyon, lenf nodu metastazı ve cerrahi sınır arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir (114). K L Zhao, J Liu ve arkadaşları 80 vaka ile yaptıkları çalışmada tümör mikroçevresindeki FOXP3+ hücre miktarı ile artmış tümör çapı arasında ilişki saptamışlardır (115). Bu çalışmalardaki bulgular ise bizim çalışmamızdaki bulguları desteklememektedir.

Çalışmamızda PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD8+ FOXP3+ hücre miktarı ile tümör çapı, diferansiasyon derecesi, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumu arasında ilişki izlenmemiştir. Ancak CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığı ile yapılan istatistiksel değerlendirmede diferansiasyon derecesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Diferansiasyon derecesi iyi diferansiyeden az diferansiyeye doğru gittikçe CD8+ FOXP3+ hücre varlığı artmaktadır. İnsan tümörleri dahil olmak üzere bir dizi ortamda CD8+ FOXP3+ T hücreleri rapor edilmiştir (74, 78, 79). N Chaput, S Louafi, A Bardier ve arkadaşları kolon tümörleri üzerine yaptıkları çalışmada tümör mikroçevresinde CD8+ FOXP3+ varlığını göstermiş ve prognostik önemi olabileceğini belirtmişlerdir (116). Jianqing Hao, Helin Wang, Lai Song ve arkadaşları küçük hücreli dışı akciğer kanserleri üzerine yaptıkları çalışmada tümör mikroçevresinde CD8+ FOXP3+ varlığını göstermiş, düşük CD8+ FOXP3+ hücre varlığının daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğunu söylemiş ve CD8+ FOXP3+ hücre varlığının küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde kritik bir role sahip olduğunu öngörmüşlerdir (117).

Liu-Sheng Peng, Yuan Zhuang, Yun Shi ve arkadaşları mide tümörleri üzerine yaptıkları çalışmada CD8+ FOXP3+ hücrelerin evre ile ilişkisi olduğunu ve tümör progresyonunda önemi olduğunu belirtmişlerdir (118). Nobuyoshi Hiraoka ve Kaoru Onozato ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PDAK'larda CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığını göstermişlerdir (2). Ancak PDAK'lar üzerine yapılmış, tümör mikroçevresinde CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığının prognostik önemi ile ilgili bulgularımızı yanlışlayacak veya destekleyecek herhangi bir yayın literatür taramasında bulunamamıştır.

Çalışmamızda PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD4+ FOXP3+ hücre miktarı ile tümör çapı, diferansiasyon derecesi, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumu arasında ilişki izlenmemiştir. Yichen Tang, Xuejun Xu, Shixiang Guo ve arkadaşları 228 vaka ile yaptıkları çalışmada PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD4+ FOXP3+ hücre miktarı ile tümörün diferansiasyon derecesi arasında ilişki olduğunu ancak tümörlerin çapı, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı ile ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir (6). Stalin Chellappa, Harald Hugenschmidt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+ FOXP3+ hücre miktarının tümörün diferansiasyon derecesi ile ilişkisi olduğunu tespit etmişlerdir (119). Nobuyoshi Hiraoka, Kaoru Onozato ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+ FOXP3+ hücre miktarının klinikopatolojik faktörlerle korele olduğunu ve düşük CD4+ FOXP3+ hücre miktarının iyi prognozu öngördüğünü söylemişlerdir (2). Bu bulgular direkt ve indirekt bizim çalışmamızdaki bulgulara benzerdir. Tetsuya Ikemoto, Takeshi Yamaguchi, Yuji Morine ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+ FOXP3+ hücre miktarı ile tümör evresi arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir (120). Bu bulgu bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları desteklememektedir.

Çalışmamızda PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD4+/CD8+ T hücre oranı ile tümör çapı, diferansiasyon derecesi, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumu arasında ilişki izlenmemiştir. Tetsuya Ikemoto, Takeshi Yamaguchi, Yuji Morine ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+/CD8+ T hücre oranı ile evre ve prognoz arasında ilişki olmadığını belirtmişlerdir (120). T. Delayre, T. Guilbaud, N. Resseguier ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+/CD8+ T hücre oranının prognostik önemi olmadığını belirtmişlerdir (119). Bu bulgular direkt ve indirekt bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. C. Yang, H. Cheng, G. Luo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada artmış CD4+/CD8+ T hücre oranının kötü prognozu öngördüğünü söylemişlerdir (121). Bu bulgu ise bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları desteklememektedir.

İmmünohistokimyasal pozitif boyanma miktarlarının birbirleriyle olan korelasyonları değerlendirildiğinde ise FOXP3+ hücre miktarı ile CD8+FOXP3+ hücre miktarı arasında orta düzeyli doğrusal bir korelasyon varlığı saptandı. Aynı şekilde FOXP3+ hücre miktarı ile CD4+FOXP3+ hücre miktarı arasında yüksek düzeyli doğrusal bir korelasyon varlığı saptandı. Bu durum tüm prognostik parametrelerin değerlendirmesinde FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olmasını destekler niteliktedir. Aynı zamanda bu hücrelerin tümöre karşı immüniteyi azaltma ve antiinflamatuvar etki noktasında birlikte hareket ettiklerini göstermektedir. CD4+/CD8+ T hücre oranı ile diğerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Tetsuya Ikemoto, Takeshi Yamaguchi, Yuji Morine ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+ FOXP3+ hücre miktarı ile CD4+/CD8+ T hücre oranı arasında korelasyon olmadığını belirtmişlerdir (120). Giovanna Roncador, Philip J Brown, Lorena Maestre ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CD4+ FOXP3+ hücrelerin FOXP3+ hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturduğunu ve FOXP3+ hücrelerin az bir kısmının da CD8+

FOXP3+ hücrelerden oluştuğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda CD4+ FOXP3+ hücre miktarı ile FOXP3+ hücre miktarının ve CD8+ FOXP3+ hücre miktarı ile FOXP3+ hücre miktarının arasında doğrusal bir korelasyon olduğunu söylemişlerdir (74). Bu bulgular bizim çalışmamızdaki bulgularımızı direkt ve indirekt destekler niteliktedir.



6-SONUÇLAR

1- Çalışmamızdaki 50 hastanın 24'ü (%48) erkek, 26'sı (%52) kadındı. Hastaların yaş ortalaması $69,54 \pm 10,334$ olup hastalar 48-89 yaş aralığındaydı.

2- Çalışmamızda PDAK'ların 46'sı (%92) baş, 1'i (%2) gövde ve 3'ü (%6) kuyruk yerleşimliydi.

3- Çalışmaya dahil edilen vakalara ait materyallerin makroskopik değerlendirmesinde, tümörlerin en küçüğü 0,4 cm, en büyüğü 10 cm çapa sahip olup ortalama tümör çapı $3,85 \pm 1,68$ cm'dir. Baş yerleşimli tümörler ortalama $3,65 \pm 1,58$ cm çapa sahipken gövde ve kuyruk yerleşimli tümörler ortalama $6,08 \pm 1,31$ cm çapındadır.

4- Çalışmaya dahil edilen 50 PDAK vakasının 19'u (%38) iyi diferansiye, 24'ü (%48) orta derecede diferansiye, 7'si (%14) az diferansiye olarak izlendi.

5- Vakaların 24'ünde (%48) lenfovasküler invazyon izlenmezken 26'sında (%52) lenfovasküler invazyon izlendi.

6- Vakaların 17'sinde (%34) perinöral invazyon izlenmezken 33'ünde (%66) perinöral invazyon izlendi.

7- Vakaların 17'sinde (%34) lenf nodu tutulumu izlenmezken 33'ünde (%66) lenf nodu tutulumu izlendi.

8- Vakaların 26'sında (%52) cerrahi sınırlarda tümör izlenmemişken, 24'ünde (%48) cerrahi sınırlarda tümör saptanmıştır. 24 vakanın 18'inde

(%75) retroperitoneal cerrahi sınırdaki, 2'sinde (%8,33) pankreas distal cerrahi sınırında, 2'sinde (%8,33) hem pankreas distal cerrahi sınırında hem retroperitoneal cerrahi sınırdaki, 2'sinde (%8,33) hem koledok cerrahi sınırında hem retroperitoneal cerrahi sınırdaki tümör izlenmiştir.

9- Vakaların 10'unda (%20) çevre doku invazyonu izlenmemiş olup 40'ında (%80) çevre doku invazyonu mevcuttur. 40 vakanın 6'sında (%15) sadece peripankreatik yağlı doku invazyonu, 6'sında (%15) sadece duodenum invazyonu, 6'sında (%15) sadece ampulla invazyonu, 2'sinde (%5) sadece koledok invazyonu izlenmiş olup 20'sinde (%50) birden fazla doku invazyonu bir arada görülmüştür.

10- PDAK'larda tümör çapı $\leq 3,85$ cm olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,98 \pm 7,41$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,44 \pm 0,55$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,30 \pm 8,48$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,94 \pm 0,38$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %60,7, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %39,3'tür. Tümör çapı $> 3,85$ cm olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,20 \pm 5,58$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,53 \pm 1,16$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,92 \pm 7,36$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,91 \pm 0,32$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %45,5, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %54,5'tir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

11- PDAK'larda iyi diferansiye tümörü olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $6,85 \pm 4,94$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,36 \pm 0,60$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $8,32 \pm 5,54$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,90 \pm 0,33$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %36,8, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %63,2'dir. Orta derece diferansiye tümörü olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $11,06 \pm 6,99$, CD8+

FOXP3+ hücre ortalaması $0,40 \pm 0,54$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $13,69 \pm 8,62$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,99 \pm 0,37$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %54,2, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %45,8'dir. Az diferansiye tümörü olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $12,30 \pm 7,47$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $1,11 \pm 1,84$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $13,17 \pm 9,09$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,93 \pm 0,35$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %0'dır. Tüm gruplarda CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

12- PDAK'larda tümör evresi ≤ 2 olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,68 \pm 6,86$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,48 \pm 0,95$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,49 \pm 8,45$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,90 \pm 0,35$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %50, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %50'dir. Tümör evresi ≥ 3 olan vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,52 \pm 6,19$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,48 \pm 0,62$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,79 \pm 6,66$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,99 \pm 0,37$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %64,3, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %35,7'dir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

13- PDAK'larda lenfovasküler invazyon görülmeyen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $10,50 \pm 6,79$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,42 \pm 0,51$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $12,92 \pm 8,59$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,93 \pm 0,31$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %62,5, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %37,5'tir. Lenfovasküler invazyon görülen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $8,84 \pm 6,48$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,54 \pm 1,10$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $10,33 \pm 7,21$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,92 \pm 0,39$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %46,2, CD8+ FOXP3+ hücre

bulunmayan vaka oranı %53,8'dir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

14- PDAK'larda perinöral invazyon görülmeyen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $8,90 \pm 3,97$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,46 \pm 0,63$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,37 \pm 5,89$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,97 \pm 0,31$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %52,9, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %47,1'dir. Perinöral invazyon görülen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $10,01 \pm 7,66$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,49 \pm 0,97$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,68 \pm 8,88$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,91 \pm 0,37$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %54,5, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %45,5'tir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

15- PDAK'larda lenf nodu metastazı görülmeyen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $11,60 \pm 7,81$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,32 \pm 0,51$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $13,75 \pm 8,99$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,88 \pm 0,32$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %47,1, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %52,9'dur. Lenf nodu metastazı görülen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $8,62 \pm 5,78$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,56 \pm 0,99$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $10,45 \pm 7,21$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,95 \pm 0,37$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %57,6, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %42,4'tür. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

16- PDAK'larda cerrahi sınırdaki tümör görülmeyen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,27 \pm 5,13$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,41 \pm 0,50$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,85 \pm 7,18$, CD4+/CD8+ hücre oranı

ortalama $0,91\pm0,29$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %57,7, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %42,3'tür. Cerrahi sınırdaki tümör görülen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $10,03\pm8,02$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,55\pm1,14$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,28\pm8,82$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,95\pm0,42$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %50, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %50'dir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

17- PDAK'larda çevre doku invazyonu görülmeyen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,82\pm6,93$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,25\pm0,35$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $13,86\pm10,99$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,96\pm0,32$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %50, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %50'dir. Çevre doku invazyonu görülen vakalarda FOXP3+ hücre ortalaması $9,59\pm6,62$, CD8+ FOXP3+ hücre ortalaması $0,54\pm0,95$, CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması $11,00\pm7,04$, CD4+/CD8+ hücre oranı ortalama $0,92\pm0,36$ olup CD8+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %55, CD8+ FOXP3+ hücre bulunmayan vaka oranı %45'dir. Her iki grupta da CD4+ FOXP3+ hücre bulunan vaka oranı %100'dür.

18- Yapılan tüm değerlendirmelerde PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücre ortalaması CD8+ FOXP3+ hücre ortalamasından daha fazladır. CD8+ FOXP3+ hücre izlenmeyen vakalar mevcut olmakla birlikte CD4+ FOXP3+ hücre izlenmeyen vaka yoktur.

19- PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücre miktarı ile tümörlerin diferansiasyon derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p=0,034$). Bu ilişki iyi diferansiye ve orta derecede

diferansiye tümörler arasında anlamlı bulunmuştur ($p=0,015$). Diğer parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur.

20- PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı iyi diferansiyeden az diferansiye doğru oransal olarak artmakla birlikte diferansiyasyon derecesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığı ile diferansiyasyon derecesi arasında yapılan değerlendirmede anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0,05$, $p=0,016$) görülmüştür. Diğer parametrelerle CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Bununla birlikte CD8+ FOXP3+ hücre miktarının/varlığının ileri evre, perinöral invazyon varlığı, lenf nodu metastazı varlığı ve çevre doku invazyonu varlığında artmakta olduğu görülmüştür.

21- PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı ile diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Ancak CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarının tümörün diferansiyasyon derecesi iyi diferansiyeden az diferansiye doğru gittikçe, ileri evre tümörlerde ve tümörde perinöral invazyon varlığında artma eğiliminde olduğu görülmüştür.

22- PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen CD4+/CD8+ T hücre oranı ile diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Ancak CD4+/CD8+ hücre oranının ileri evre tümörlerde ve lenf nodu metastazı varlığında artmakta olduğu görülmüştür.

23- PDAK'larda tümör mikroçevresinde izlenen FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı arasında orta düzeyde, FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı arasında

yüksek düzeyde doğrusal bir korelasyon mevcuttur. CD4+/ CD8+ T hücre oranı ile korelasyon görülmemiştir.

24- Çalışmaya dahil edilen PDAK'a ait 50 vakanın prognostik parametreleri ve immünohistokimyasal boyama sonuçları ile yapılan değerlendirme neticesinde; FOXP3+ hücrelerin miktarı ile diferansiasyon derecesi arasında ilişki görülmüş olup, elde edilen bulgular literatür ile benzerdir. CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı ile yapılan değerlendirmede diferansiasyon derecesi ile ilişki görülmüş olup literatürde farklı tümörlerde CD8+ FOXP3+ hücreler gösterilerek prognostik önemi belirtilmekle beraber PDAK'lar üzerine bulgularımızı yanlışlayacak ya da doğrulayacak bir çalışmaya rastlanmamıştır. CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığının ve CD4+/CD8+ T hücre oranının prognostik parametrelerle ilişkisi izlenmemiştir. FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarının orta düzeyde korele olması, FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarının yüksek düzeyde korele olması, tüm prognostik parametrelerin değerlendirmesinde FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasının CD8+ FOXP3+ hücrelerin ortalamasından daha fazla olmasını destekler niteliktedir. Aynı zamanda bu hücrelerin tümöre karşı immüniteyi azaltma ve antiinflamatuvar etki noktasında birlikte hareket ettiklerini göstermektedir. CD8+ FOXP3+ hücre miktarının/varlığının diferansiasyon derecesi, ileri evre, perinöral invazyon varlığı, lenf nodu metastazı varlığı ve çevre doku invazyonu varlığında artmakta olduğu görülmüştür. CD4+ FOXP3+ hücre miktarının tümörün diferansiasyon derecesi arttıkça, ileri evre tümörlerde ve perinöral invazyon varlığında artmakta olduğu dikkati çekmiştir. Benzer şekilde CD4+/CD8+ hücre oranının ileri evre tümörlerde ve lenf nodu metastazı varlığında artmakta olduğu görülmüştür. Bu durum, çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmese de daha fazla vaka ile yapılan çalışmalarda diğer prognostik parametreler ile de anlamlı sonuç elde edilebileceğini düşündürmüştür.

25- Sonuç olarak elde ettiğimiz tüm bu bulgular, tümör durumunda, normal fonksiyonu metabolizmayı immünopatolojiden korumak olan FOXP3+ hücrelerin ve bunlar içerisinde CD4+ FOXP3+ hücreler ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin tümöre karşı gelişen immüneteyi baskılayarak tümörün prognozunu kötüleştirdiğini düşündürmüştür. Bu durumda, bu hücrelerin, kemoterapi ve radyoterapiye en dirençli kanserler arasında yer alan, tedavi şansı olarak sadece cerrahi rezeksiyonun önerildiği PDAK'larda tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceği söylenebilir.



7-ÖZET

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) kanser ilişkili ölüm nedenlerinde ön sıralarda yer alan, agresif gelişen, erken metastatik yayılım yapan bir tümördür. Ayrıca PDAK kemoterapi ve radyoterapiye en dirençli kanserler arasındadır. Kür şansı olarak sadece cerrahi tedavi önerilmektedir.

PDAK'lar yoğun stromal fibrozise sahiptirler ve tümör mikroçevresinde Treg hücreleri ve CD4+ veya CD8+ T hücreleri içeren yoğun inflamasyon mevcuttur. Treg hücreleri, FOXP3'ün ekspresyonu ile tanımlanır, ancak FOXP3 ekspresyonu, aktive olmuş hücrelerde (CD8+ T hücreler, aktive CD4+ T hücreler gibi) geçici olarak indüklenebilir. Genel olarak, FOXP3+ Treg hücreler bir dizi mekanizma yoluyla baskılayıcı/antiinflamatuvar işlevler uygular. Günümüzde Treg hücrelerin kansere karşı immunitiyi engellemede önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bununla birlikte PDAK'larda tümör mikroçevresinin diğer elemanları arasında yer alan CD4+ ve CD8+ T hücre oranının ilerlemiş prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. PDAK'larda tümör mikroçevresindeki FOXP3+ hücrelerin, bunlar içerisinde CD4+ FOXP3+ hücreler ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarının/varlığının, tümör mikroçevresindeki CD4+ ve CD8+ T hücre oranının prognostik önemi anlaşılabilirse bunları hedef alan tedavi yaklaşımları geliştirilebilir.

Bu çalışmada pankreas adenokarsinomlarında tümör mikroçevresinde CD4, CD8, FOXP3 ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmamız için 01.01.2013-31.12.2018 tarihleri arasında merkezimizde PDAK sebebiyle opere edilmiş 50 vakanın rezeksiyon materyallerinin tümör blokları kullanıldı. Bu vakalara immünohistokimyasal

double boyama yöntemi ile FOXP3-CD4 antikorları ile FOXP3-CD8 antikorları uygulandı. Boyama sonuçları ışık mikroskopu altında değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede bu veriler ve bu verilerden elde edilen oranlar kullanıldı.

Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu, bağımsız grupların ortalamasının karşılaştırılması, kategorik verilerin gruplar arası yüzde dağılımları, birden fazla sürekli verinin korelasyonu SPSS v20 kullanılarak hesaplandı.

PDAK'larda tümördeki FOXP3+ hücre miktarı arttıkça tümörün diferansiasyon derecesinin azaldığı, CD8+ FOXP3+ hücrelerin varlığı ile tümörün diferansiasyon derecesinin azaldığı görülmüştür. CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı/varlığı, CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı ve CD4+/CD8+ T hücrelerin oranı ile tümörlerin çapı, diferansiasyon derecesi, evresi, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, cerrahi sınır ve çevre doku invazyon durumları arasında ilişki izlenmemiştir. FOXP3+ hücrelerin içerisinde CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarının CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarından daha fazla olduğu görülmüştür. CD8+ FOXP3+ hücre izlenmeyen vakalar mevcut olmakla birlikte CD4+ FOXP3+ hücre izlenmeyen vaka yoktur. Ayrıca FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD8+ FOXP3+ hücrelerin miktarı arasında orta düzeyli, FOXP3+ hücrelerin miktarı ile CD4+ FOXP3+ hücrelerin miktarı arasında yüksek düzeyli doğrusal bir korelasyon mevcuttur. CD4+/ CD8+ T hücre oranı ile herhangi bir korelasyon görülmemiştir.

8-SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive and early metastatic tumor that is one of the leading causes of cancer-related death. In addition, PDAC is among the most resistant cancers to chemotherapy and radiotherapy. Only surgical treatment is recommended as a cure chance.

PDACs have intense stromal fibrosis and there is intense inflammation involving Treg cells and CD4+ or CD8+ T cells in the tumor microenvironment. Treg cells are identified by the expression of FOXP3, but FOXP3 expression can be transiently induced in activated cells (such as CD8+ T cells, activated CD4+ T cells). Generally, FOXP3+ Treg cells exert suppressive / anti-inflammatory functions through a number of mechanisms. Today, it is believed that Treg cells play an important role in preventing immunity against cancer. However, it is thought that the ratio of CD4+ and CD8+ T cells, which are among the other elements of the tumor microenvironment, in PDACs may be related to the advanced prognosis. If the prognostic importance of FOXP3+ cells in the tumor microenvironment, the amount/presence of CD4+ FOXP3+ cells and CD8+ FOXP3+ cells in them, and the ratio of CD4+ and CD8+ T cells in the tumor microenvironment can be understood, treatment approaches targeting them can be developed.

In this study, it was aimed to evaluate the CD4, CD8, FOXP3 expressions in the tumor microenvironment in pancreatic adenocarcinomas immunohistochemically and to investigate the relationship with other prognostic parameters. For our study, tumor blocks of the resection materials of 50 cases operated for PDAC in our center between 01.01.2013-31.12.2018 were used. FOXP3-CD4 antibodies and FOXP3-CD8

antibodies were applied to these cases by immunohistochemical double staining method. Staining results were evaluated under a light microscope. These data and the ratios obtained from these data were used in the statistical evaluation.

Compliance of the obtained data to normal distribution, comparison of the mean of independent groups, percentage distribution of categorical data between groups, correlation of more than one continuous data were calculated using SPSS v20.

In PDACs, it was observed that as the amount of FOXP3 + cells in the tumor increased, the degree of differentiation of the tumor decreased, and the differentiation degree of the tumor decreased with the presence of CD8+ FOXP3+ cells. There was no relationship between the amount/presence of CD8+ FOXP3+ cells, the amount of CD4+ FOXP3+ cells and the ratio of CD4+/CD8+ T cells and the diameter, differentiation, stage, lymphovascular invasion, perineural invasion, lymph node metastasis, surgical margin and surrounding tissue invasion. It was observed that the amount of CD4+ FOXP3+ cells in FOXP3+ cells was greater than the amount of CD8+ FOXP3+ cells. Although there are cases without CD8 + FOXP3 + cells, there are no cases without CD4 + FOXP3 + cells. There is also a moderate linear correlation between the amount of FOXP3+ cells and the amount of CD8+ FOXP3+ cells, and a high level of linear correlation between the amount of FOXP3+ cells and the amount of CD4+ FOXP3+ cells. There was no correlation with the CD4+ / CD8+ T cell ratio.

9-KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020;70(1):7-30.
2. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(18):5423-34.
3. Lang C, Wang J, Chen L. CD25-expressing Th17 cells mediate CD8(+) T cell suppression in CTLA-4 dependent mechanisms in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Experimental cell research*. 2017;360(2):384-9.
4. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(16):4266-76.
5. Jiang Y, Du Z, Yang F, Di Y, Li J, Zhou Z, et al. FOXP3+ lymphocyte density in pancreatic cancer correlates with lymph node metastasis. *PLoS One*. 2014;9(9):e106741-e.
6. Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, et al. An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one*. 2014;9(3):e91551.
7. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(11):703-17.
8. Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, et al. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*. 1998;59(3):192-8.
9. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;28(1):e26-31.

10. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer research*. 2007;67(17):8344-50.
11. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 5. ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2014.
12. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Twelfth ed. China: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2012.
13. Tarhan ÖR. Pankreas Anatomisi, Embriyolojisi, Gelişimi 2020 [Available from: <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/pankreas/pankreas-anatomisi-embriyolojisi-gelisimi/>].
14. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*. 5 ed. United Kingdom: Elsevier; 2011.
15. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10th ed. Aytekin Y, Solakoğlu S, editors. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
16. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011.
17. Lindberg MR, Lamps LW. *Diagnostic pathology: Normal histology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
18. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(5):318-48.
19. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*. 2004;363(9414):1049-57.
20. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(43):4846-61.
21. Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1985;35(1):2-18.

22. International Agency for Research on Cancer WHO. Global Cancer Observatory 2018 [Available from: <http://gco.iarc.fr/>].
23. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World journal of gastroenterology. 2016;22(44):9694-705.
24. Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. Scientific reports. 2017;7(1):3165.
25. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. Lancet (London, England). 2011;378(9791):607-20.
26. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. The Proceedings of the Nutrition Society. 2008;67(3):253-6.
27. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Jr., Perrault J, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. Journal of the National Cancer Institute. 1997;89(6):442-6.
28. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. Langenbeck's archives of surgery. 2008;393(4):535-45.
29. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. 5 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.
30. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. Gastroenterology. 2005;129(2):504-11.
31. Holly EA, Chaliha I, Bracci PM, Gautam M. Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2004;2(6):510-7.

32. Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *The Lancet Oncology*. 2004;5(11):655-63.
33. Wanebo HJ, Vezeridis MP. Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. *Cancer*. 1996;78(3 Suppl):580-91.
34. Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS. Atlas of tumor pathology. Washington, DC: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 2007.
35. Bowlby LS. Pancreatic adenocarcinoma in an adolescent male with Peutz-Jeghers syndrome. *Human pathology*. 1986;17(1):97-9.
36. Hruban RH, Petersen GM, Ha PK, Kern SE. Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surgical oncology clinics of North America*. 1998;7(1):1-23.
37. Lynch HT, Brand RE, Hogg D, Deters CA, Fusaro RM, Lynch JF, et al. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*. 2002;94(1):84-96.
38. Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, et al. Familial pancreatic cancer: a review. *Seminars in oncology*. 1996;23(2):251-75.
39. Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *The New England journal of medicine*. 1992;326(7):455-65.
40. Meckler KA, Brentnall TA, Haggitt RC, Crispin D, Byrd DR, Kimmey MB, et al. Familial fibrocystic pancreatic atrophy with endocrine cell hyperplasia and pancreatic carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(8):1047-53.
41. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(14):5619-24.
42. van Riel JM, Giaccone G, Pinedo HM. Pancreaticobiliary cancer: the future aspects of medical oncology. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 1999;10 Suppl 4:296-9.

43. Côté GA, Smith J, Sherman S, Kelly K. Technologies for imaging the normal and diseased pancreas. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1262-71.e1.
44. Fitzgerald PJ, Fortner JG, Watson RC, Schwartz MK, Sherlock P, Benua RS, et al. The value of diagnostic aids in detecting pancreas cancer. *Cancer*. 1978;41(3):868-79.
45. Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 11 ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
46. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(4):547-60.
47. Shi C, Klein AP, Goggins M, Maitra A, Canto M, Ali S, et al. Increased Prevalence of Precursor Lesions in Familial Pancreatic Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(24):7737-43.
48. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. 4 ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
49. Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, et al. Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):19731-62.
50. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, et al. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(12):1730-41.
51. Wood LD. Pancreatic cancer genomes: toward molecular subtyping and novel approaches to diagnosis and therapy. *Molecular diagnosis & therapy*. 2013;17(5):287-97.
52. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5897):1801-6.
53. Shibuya KC, Goel VK, Xiong W, Sham JG, Pollack SM, Leahy AM, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma contains an effector and regulatory immune cell

infiltrate that is altered by multimodal neoadjuvant treatment. *PloS one*. 2014;9(5):e96565.

54. Seo YD, Pillarisetty VG. T-cell programming in pancreatic adenocarcinoma: a review. *Cancer gene therapy*. 2017;24(3):106-13.

55. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(2):107-19.

56. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews Immunology*. 2014;14(6):377-91.

57. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Advances in immunology*. 2008;99:59-94.

58. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual review of immunology*. 2018;36:579-601.

59. Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8(+) and CD4(+) T Cells. *International review of cell and molecular biology*. 2018;341:63-124.

60. Tubo NJ, Jenkins MK. TCR signal quantity and quality in CD4(+) T cell differentiation. *Trends Immunol*. 2014;35(12):591-6.

61. Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(7):705-13.

62. Dent AL, Kaplan MH. T cell regulation of hematopoiesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:6229-36.

63. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology*. 2009;70(4):326-36.

64. Nikolova M, Lelievre JD, Carriere M, Bensussan A, Lévy Y. Regulatory T cells differentially modulate the maturation and apoptosis of human CD8+ T-cell subsets. *Blood*. 2009;113(19):4556-65.

65. Başkan EB. T hücre immunitesi/T cell immunity. *Turkderm*. 2013;47(1):18-23.
66. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(3):253-7.
67. Taylor PA, Friedman TM, Korngold R, Noelle RJ, Blazar BR. Tolerance induction of alloreactive T cells via ex vivo blockade of the CD40:CD40L costimulatory pathway results in the generation of a potent immune regulatory cell. *Blood*. 2002;99(12):4601-9.
68. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology*. 2009;10(9):1000-7.
69. Kim M, Grimmig T, Grimm M, Lazariotou M, Meier E, Rosenwald A, et al. Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer. *PloS one*. 2013;8(1):e53630.
70. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi GJFil. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. 2019;10.
71. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):8509-21.
72. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*. 2001;27(1):68-73.
73. Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. 2010;29(29):4121-9.
74. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European journal of immunology*. 2005;35(6):1681-91.
75. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;146(5):772-84.

76. Mailer RK, Joly AL, Liu S, Elias S, Tegner J, Andersson J. IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Scientific reports*. 2015;5:14674.
77. Ware R, Jiang H, Braunstein N, Kent J, Wiener E, Pernis B, et al. Human CD8+ T lymphocyte clones specific for T cell receptor V beta families expressed on autologous CD4+ T cells. *Immunity*. 1995;2(2):177-84.
78. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(23):6947-58.
79. Kim HJ, Wang X, Radfar S, Sproule TJ, Roopenian DC, Cantor H. CD8+ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(5):2010-5.
80. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2007;123(1):18-29.
81. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annual review of immunology*. 2007;25:297-336.
82. Monteiro M, Almeida CF, Caridade M, Ribot JC, Duarte J, Agua-Doce A, et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(4):2157-63.
83. Devaud C, Yong CS, John LB, Westwood JA, Duong CP, House CM, et al. Foxp3 expression in macrophages associated with RENCA tumors in mice. *PloS one*. 2014;9(9):e108670.
84. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
85. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology*. 2013;10(2):122-32.
86. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by

converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*. 2011;71(10):3505-15.

87. Noh J, Noh G, Kim HS, Kim AR, Choi WS. Allergen-specific responses of CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Bregs) and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions. *Cellular immunology*. 2012;274(1-2):109-14.

88. de Andrés C, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Valor L, Teijeiro R, Ramos-Medina R, et al. New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of neuroimmunology*. 2014;270(1-2):37-44.

89. Vadasz Z, Peri R, Eiza N, Slobodin G, Balbir-Gurman A, Toubi E. The Expansion of CD25 high IL-10 high FoxP3 high B Regulatory Cells Is in Association with SLE Disease Activity. *Journal of immunology research*. 2015;2015:254245.

90. Wang L, Liu R, Li W, Chen C, Katoh H, Chen GY, et al. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer cell*. 2009;16(4):336-46.

91. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, et al. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*. 2007;129(7):1275-86.

92. Wang X, Lang M, Zhao T, Feng X, Zheng C, Huang C, et al. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3(+)Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017;36(21):3048-58.

93. CellMarque. FOXP3 (EP340) Rabbit Monoclonal Antibody 2017 [Available from: https://www.cellmarque.com/antibodies/EP/3457/FOXP3_EP340].

94. LeicaBiosystems. Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD8 Product Code: NCL-L-CD8-4B11 2018 [Available from: <https://shop.leicabiosystems.com/us/ihc-ish/ihc-primary-antibodies/pid-cd8>].

95. LeicaBiosystems. Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD4 Product Code: NCL-L-CD4-368 2018 [Available from: <https://shop.leicabiosystems.com/us/ihc-ish/ihc-primary-antibodies/pid-cd4>].

96. GP SG, Das P, Baloda V, Singh A, Vishnubhatla S, Gupta SD, et al. Duodenal mucosal immune cells in treatment-naïve adult patients with celiac disease having different histological grades and controls. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2019;62(3):399-404.
97. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A, et al. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast cancer research and treatment*. 2014;148(3):525-34.
98. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17(1):124.
99. Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Räägo T, Honkanen J, Vaarala O, et al. Increased FOXP3 expression in small-bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2009;44(4):422-30.
100. Takahashi H, Katsuta E, Yan L, Tokumaru Y, Katz MHG, Takabe K. Transcriptomic Profile of Lymphovascular Invasion, a Known Risk Factor of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Metastasis. *Cancers*. 2020;12(8).
101. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, et al. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2006;10(9):1199-210; discussion 210-1.
102. Li J, Ma Q, Liu H, Guo K, Li F, Li W, et al. Relationship between neural alteration and perineural invasion in pancreatic cancer patients with hyperglycemia. *PLoS One*. 2011;6(2):e17385.
103. Liebl F, Demir IE, Mayer K, Schuster T, D'Haese JG, Becker K, et al. The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Annals of surgery*. 2014;260(5):900-7; discussion 7-8.
104. Hirai I, Kimura W, Ozawa K, Kudo S, Suto K, Kuzu H, et al. Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2002;24(1):15-25.

105. Liu H, Ma Q, Xu Q, Lei J, Li X, Wang Z, et al. Therapeutic potential of perineural invasion, hypoxia and desmoplasia in pancreatic cancer. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(17):2395-403.
106. Carr RA, Roch AM, Zhong X, Ceppa EP, Zyromski NJ, Nakeeb A, et al. Prospective Evaluation of Associations between Cancer-Related Pain and Perineural Invasion in Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2017;21(10):1658-65.
107. Verbeke CS. Resection margins in pancreatic cancer. *The Surgical clinics of North America*. 2013;93(3):647-62.
108. Hsu CC, Herman JM, Corsini MM, Winter JM, Callister MD, Haddock MG, et al. Adjuvant chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma: the Johns Hopkins Hospital-Mayo Clinic collaborative study. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(4):981-90.
109. Gnerlich JL, Luka SR, Deshpande AD, Dubray BJ, Weir JS, Carpenter DH, et al. Microscopic margins and patterns of treatment failure in resected pancreatic adenocarcinoma. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2012;147(8):753-60.
110. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
111. Saka B, Balci S, Basturk O, Bagci P, Postlewait LM, Maithel S, et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is Spread to the Peripancreatic Soft Tissue in the Majority of Resected Cases, Rendering the AJCC T-Stage Protocol (7th Edition) Inapplicable and Insignificant: A Size-Based Staging System (pT1: ≤ 2 , pT2: $>2\text{--}4$, pT3: >4 cm) is More Valid and Clinically Relevant. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(6):2010-8.
112. Jiang Y, Du Z, Yang F, Di Y, Li J, Zhou Z, et al. FOXP3+ lymphocyte density in pancreatic cancer correlates with lymph node metastasis. *PLoS One*. 2014;9(9):e106741.
113. Diana A, Wang LM, D'Costa Z, Allen P, Azad A, Silva MA, et al. Prognostic value, localization and correlation of PD-1/PD-L1, CD8 and FOXP3 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(27):40992-1004.

114. Wartenberg M, Zlobec I, Perren A, Koelzer VH, Gloor B, Lugli A, et al. Accumulation of FOXP3+T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4190-201.
115. Zhao KL, Liu J, Jiang WN, Hao JH. [Prognostic value of tumor infiltration immune cells in pancreatic cancer]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*. 2018;56(6):464-70.
116. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Ménégaux F, et al. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut*. 2009;58(4):520-9.
117. Hao J, Wang H, Song L, Li S, Che N, Zhang S, et al. Infiltration of CD8(+) FOXP3(+) T cells, CD8(+) T cells, and FOXP3(+) T cells in non-small cell lung cancer microenvironment. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2020;13(5):880-8.
118. Peng LS, Zhuang Y, Shi Y, Zhao YL, Wang TT, Chen N, et al. Increased tumor-infiltrating CD8(+)Foxp3(+) T lymphocytes are associated with tumor progression in human gastric cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(11):2183-92.
119. Delayre T, Guilbaud T, Resseguier N, Mamessier E, Rubis M, Moutardier V, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes and cancer-associated fibroblasts in patients with pancreatic adenocarcinoma of the body and tail undergoing resection. *The British journal of surgery*. 2020;107(6):720-33.
120. Ikemoto T, Yamaguchi T, Morine Y, Imura S, Soejima Y, Fujii M, et al. Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2006;33(4):386-90.
121. Yang C, Cheng H, Luo G, Lu Y, Guo M, Jin K, et al. The metastasis status and tumor burden-associated CA125 level combined with the CD4/CD8 ratio predicts the prognosis of patients with advanced pancreatic cancer: A new scoring system. *European Journal of Surgical Oncology*. 2017;43(11):2112-8.