

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

PANKREAS KANSERLERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLİŞKİLİ
MORFOLOJİ İLE GATA6 VE LOXL2 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK
ÖNEMİ

DR. ELİF YUMUK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2023

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

PANKREAS KANSERLERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLİŞKİLİ
MORFOLOJİ İLE GATA6 VE LOXL2 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK
ÖNEMİ

DR. ELİF YUMUK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ÖZGÜL SAĞOL

İZMİR-2023

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 Pankreas Hakkında Genel Bilgiler	8
2.1.1 Anatomi	8
2.1.2 Embriyoloji ve Histoloji	8
2.1.3 Fizyoloji	9
2.1.4 Pankreasın Arteriyel ve Venöz Dolaşımı	10
2.1.5. Lenfatik Drenaj ve Sinirler	10
2.2 Pankreas Duktal Adenokarsinomları Hakkında Genel Bilgiler	10
2.2.1 Prekürsöz Lezyonlar	10
2.2.1.1 Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi (Pan IN).....	11
2.2.1.2 İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi (IPMN).....	11
2.2.1.3 İntraduktal Onkositik Papiller Müsinöz Neoplazm	11
2.2.1.4 İntraduktal Tubulopapiller Neoplazm	11
2.2.1.5 Müsinöz Kistik Neoplazi	12
2.2.2 Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	12
2.2.3 Makroskopik Özellikler	12
2.2.4 Mikroskopik Özellikler.....	13
2.2.5 Tümör Stroması.....	13
2.2.6 Histolojik varyantları	14

2.2.7 İmmunhistokimyasal Bulgular.....	14
2.2.8 PDAK'ta Görülebilen Mutasyonlar	15
2.2.9 Pankreasın Moleküler Sınıflaması.....	15
2.2.10 Pankreas Tümörlerinin TNM Klasifikasyonu ve Evrelemesi	16
2.3 Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT).....	18
2.3.1 EMT Tanımı.....	18
2.3.2 Epitel hücrelerinde apikal bazal polarite	18
2.3.3 EMT patogenezinde yer alan moleküller	19
2.3.4 EMT ve Tümör Tomurcuklanması.....	19
2.3.5 EMT ve İmmun histokimyasal Belirteçler.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1 Olguların Seçilmesi	23
3.2 Histopatolojik Değerlendirme.....	24
3.2.1 Tümör tomurcuklanması (TT).....	24
3.2.2 Mezenkimal Fenotip (MP)- Ön-arka polarite değişimi (Front-back polarity)	26
3.2.3 Apikal-Bazal Hücre Polarite Kaybı (ABHPK)	28
3.2.4 Tomurcuktan büyük hücre grupları (TBHG).....	29
3.2.5 İnkomplet glandlar	31
3.2.6 Asiner duktal metaplazi (ADM)	32
3.2.7 Tümör içi ve çevresi lenfositik infiltrat (Tİİ, TÇLİ).....	34
3.2.8 Stroma miktarı	36
3.2.9 Nekroz.....	38
3.3 İmmunhistokimyasal Boyama.....	39
3.3.1 LOXL2 İmmunhistokimyası Değerlendirmesi.....	40

3.3.2 E-Cadherin İmmunhistokimyası Değerlendirmesi.....	44
3.3.3 Vimentin ve Keratin Değerlendirilmesi.....	46
3.4 İstatiksel Analiz.....	48
3.5 GATA6'nın İn Silico Yöntemler ile Araştırılması	49
4. BULGULAR	50
4.1 Olguların Demografik ve Klinikopatolojik Özellikleri.....	50
4.2 İzlem Verileri.....	52
4.3 İmmunhistokimyasal bulgular	53
4.4 Morfolojik bulguların immunhistokimyasal bulgularla ilişkisi	55
4.5 Morfolojik ve İmmunhistokimyal Bulguların Prognostik Parametreler ile İlişkisi	55
4.5.1 Morfolojik bulgular ve prognostik parametreler	55
4.5.2 İmmunhistokimyasal bulgular ve prognostik parametreler	59
4.6 Bulguların sağkalım ile ilişkisi	60
4.7 GATA6 Gen Değişiklikleri ve EMT İlişkisi.....	75
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ.....	88
7. KAYNAKLAR	90

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: PDAK farklı moleküler subtipler.....	16
Tablo 2: PDAK 'larda klinik TNM evrelemesi.....	17
Tablo 3: LOXL2 epitelyal boyanma yoğunluğu skorlaması.....	41
Tablo 4: Olgulara ait klinikopatolojik özellikler.....	51
Tablo 5: Olgulara ait morfolojik bulgular	52
Tablo 6: İmmunhistokimyasal parametrelerin olgulara dağılımı	54
Tablo 7: LOXL2 stromal hücre ve epitelyal hücre boyanması arasındaki ilişki.....	54
Tablo 8: Vimentin ekspresyonu ile TÇLİ arasındaki ilişki	55
Tablo 9: E-Cadherin kaybı ile tümör nekrozu arasındaki ilişki	55
Tablo 10: Tümör diferansiasyonu ve araştırılan morfolojik parametrelerin ilişkisi	57
Tablo 11: Peritümöral Tomurcuklanma ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan morfolojik parametreler	57
Tablo 12: Yüksek derecede PTT ile asiner duktal metaplazi varlığı ilişkisi.....	58
Tablo 13: İntratümöral tomurcuklanma ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametreler	58
Tablo 14: Yüksek dereceli intratümöral tomurcuklanma ile stroma ilişkisi	58
Tablo 15: Lenfovasküler invazyon ile MP arasındaki ilişki.....	59
Tablo 16: Evre ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan immünhistokimyasal Parametreler	60
Tablo 17: Sağ kalımla ilişkili bulgular.....	63
Tablo 18: Morfolojik ve immnuhistokimyasal bulguların nüks ve sağ kalım ile ilişkisi.....	64
Tablo 19: Sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametreler	70
Tablo 20: GATA6 kopya sayısı değişiklikleri ve EMT yolları ile ilişkili genler.....	75

Tablo 21: Artmış FEG'lerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler	76
Tablo 22: Artmış FEG'lerin ilişkili olduğu biyolojik yollar	76
Tablo 23: Log2 oranı 1'in üstünde olan FEG'lerin istatistiksel anlamlı olduğu biyolojik yollar	77



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Tümör diferansiasyonu sağkalım ilişkisi	61
Şekil 2: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Lenfovasküler invazyon sağkalım ilişkisi. ...	62
Şekil 3: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Cerrahi sınır sağkalım ilişkisi.	62
Şekil 4: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: İntratümöral tomurcuklanma sağkalım ilişkisi.	65
Şekil 5: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Peritümöral tomurcuklanma ile sağkalım süresi.	66
Şekil 6: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: MP ile sağkalım ilişkisi.	67
Şekil 7: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu ile sağkalım ilişkisi.	68
Şekil 8 : Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Nekroz ile sağkalım süresi.	69
Şekil 9: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Tümör evresi ile hastalıksız sağkalım süresi.	71
Şekil 10: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Mezenkimal fenotip ile hastalıksız sağkalım süresi.	72
Şekil 11: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Nekroz ile hastalıksız sağkalım süresi.	73
Şekil 12: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: E-kadherin kaybı ile sağkalım süresi	74

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Tümör çevresi tomurcuklanma, H&E x10	25
Resim 2: Tümör içi tomurcuklanma, H&E x10	25
Resim 3: Keratin ile pozitif tümör tomurcuklanması, İHK x10	26
Resim 4: İğsi, elonge morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, H&E x20.....	27
Resim 5: İğsi, elonge morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, H&E x20.....	27
Resim 6: İğsi, elonge morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, H&E x20.....	28
Resim 7: İğsi morfolojiye sahip diskoheziv malign hücreler, H&E x10	28
Resim 8: Malign epitelyal hücrelerin düzensiz ve şekilsiz sıralanması, H&E x20	29
Resim 9: Tomurcuklanmadan büyük hücre grupları, H&E x10.....	30
Resim 10: Tomurcuklanmadan büyük hücre grupları, H&E x20	30
Resim 11: Bütünüğü bozulmuş glandlar, H&E, x10.....	31
Resim 12: Bütünüğü bozulmuş glandlar, H&E, x10.....	32
Resim 13: Asiner duktal metaplazi, H&E x10	33
Resim 14: Asiner duktal metaplazi, H&E x5.....	33
Resim 15: Tümör içi lenfosittik yanıt, 1 BBA'da epiteli infiltre eden 1 veya 2 lenfosit, hafif orta infiltratif yanıt (1), H&E x20	34
Resim 16: Tümör içi lenfosittik yanıt, 1 BBA'da epiteli infiltre eden 3 veya daha fazla lenfosit, yüksek infiltratif yanıt (2), H&E x20	35
Resim 17: Tümör çevresi düşük infiltratif yanıt (1), H&E x2	35
Resim 18: Tümör çevresi yüksek infiltratif yanıt (2), H&E x2.....	36
Resim 19: Az miktarda stroma (1), H&E x10.....	37
Resim 20: Orta miktarda stroma (2), H&E x10.....	37

Resim 21: Belirgin miktarda stroma (3), H&E x10	38
Resim 22: Tümör içerisinde yaygın nekroz alanları, H&E x5	39
Resim 23: LOXL2 kontrol dokusu. Endometrioid karsinomunda sitoplazmik boyanma, İHK x10	40
Resim 24: LOXL2 negatif tümör (0), İHK x10	41
Resim 25: LOXL2 zayıf epitelyal boyanma (1), İHK x10	42
Resim 26: LOXL2 epitelyal zayıf-orta boyanma (2), İHK x10	43
Resim 27: LOXL2 stromal boyanma (2), İHK x10	44
Resim 28: E-kadherin pozitifliği, İHK x10	45
Resim 29: E-kadherin kaybı, İHK x10	46
Resim 30: Tümörde ve tomurcuklanma görülen hücrelerde vimentin negatifliği, İHK x10	47
Resim 31: Tümörde ve tomurcuklanan hücrelerde vimentin pozitifliği, İHK x10	48

KISALTMALAR

PDAC: Pankreas duktal adenokarsinomu

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition

LOXL2: LOX-like 2

TT: Tümör tomurcuklanması

SMA: Superior mezenterik arter

PDA: Pankreatikoduodenal arter

SMV: Superior mezenterik ven

PanIN: Pankreatik intraepitelyal neoplazi

IPMN: İntraduktal papiller müsinöz neoplazm

MKN: Müsinöz kistik neoplazi

FAP: Familial Adenomatöz Polipozis

FAMMM: Familial atipik multipl mol melanom sendromu

KİF: kanserle ilişkili fibroblastlar

TGF- β : Transforming growth factor beta

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

PDGF: Platelet-derived growth factor

ECM: Extracellular matrix

Treg: Regulatory T cells MDSC: Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler

AJCC: American Joint Committee on Cancer

HGF: Hepatosit growth factor

LOXL1-4: LOX like 1-4

LOX: Lisil oksidaz

HE: Hematoksilen-Eozin

ITBCC: International Tumor Budding Consensus Conference

PTT: Peritümöral tomurcuklanma

İTT: İntratümöral tomurcuklanma

TBHG: Tomurcuktan büyük hücre grupları

ADM: Asiner duktal metaplazi

TÇLİ: Tümör çevresi lenfosittik infiltrat

TİLİ: Tümör çevresi lenfosittik infiltrat

CAP: College of American Pathologists

BBA: Büyük büyütme alanı

KBA: Küçük büyütme alanı

İHK: İmmunhistokimya

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

FEG: Farklı eksprese edilen genler

DFS: Disease free survival

OS: Overall survival

LVi: Lenfovasküler invazyonu

ABHPK: Apikal bazal hücre polarite kaybı

PNİ: Perinöral invazyon

ÇADM: Çevre asiner duktal metaplazi

MF: Mezenkimal fenotip

CTC: Circulating Tumor Cells

CAFs: Cancer associated fibroblasts

MDSC: Myeloid-derived suppressor cells

VEGFA: Vascular endothelial growth factor-A

pT: Tümör evresi

pN: Lenf nodu evresi

DAB: 3,3'diaminobenzidine

GO-BP: Gene Ontology Biological process

DEGs: Differentially expressed genes

FEG: Farklı eksprese edilen genler

BP: Biological process

TNM: Tumour, Nodes, Metastases

WNT: The Wingless-related integration site



TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezimin her aşamasında bana destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Özgül Sağol başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yol gösteren Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasını sağlayan sayın Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a
Çalışma süresince desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, aynı zamanda çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılmasında büyük emeği ve özverisi olan sayın Doç. Dr. Anıl Aysal Ağalar'a,

İn silico yöntemlerin yapılmasında bana yol gösteren ve tecrübelerini paylaşarak destek olan sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammed Hasan Toper'e

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli asistan hekim arkadaşlarıma,

Çalışmanın hayata geçirilmesine katkıda bulunan patoloji teknisyenleri Nalan Okay Çayan ve Hüseyin Ak'a,

Başarılarımın kaynağı, beni bugünlere getiren annem Safiye Yumuk, babam Mehmet Yumuk ve ablam Aslı Altınok'a

Bu süreçte her zaman yanımda olan Kağan Merpez'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Elif Yumuk

ÖZET

PANKREAS KANSERLERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLİŞKİLİ MORFOLOJİ İLE GATA6 VE LOXL2 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Dr. Elif Yumuk

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı / İZMİR

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), dünyada en sık görülen malignitelerden biridir ve kötü prognoz, zayıf etkili tedavi seçenekleri ve erken teşhis yöntemlerinin eksikliği ile giden agresif bir hastalıktır. Çalışmalarda, pankreas kanserinin biyolojik davranışında etkili olduğu gösterilen epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), transkripsiyon faktörlerinin aktive olması ile tümör hücrelerinin mezenkimal fenotipe dönüşerek ana tümörden ayrıldığı bir süreci tanımlamaktadır. EMT sürecinde hücreler spesifik epitelyal belirteçlerin kaybı (keratin) ve mezenkimal belirteçlerin (vimentin) kazanılmasıyla farklı morfolojik ve immünofenotipik özellikler kazanır. Ayrıca tümör hücrelerinde, E-cadherin ekspresyon kaybı ile gözlenen adezyon kaybı, tümör tomurcuklanması olarak adlandırılmış, tümörün infiltratif kenarında hücrelerin tek tek ya da 5 hücreden az küçük gruplar halinde ana tümör kitlesinden ayrı olarak gözlemlenmesi, EMT'nin bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde çok sayıda düzenleyici mekanizmadan biri GATA6 transkripsiyon faktörü ve LOX-like 2 (LOXL2) enzimidir. Pek çok çalışmada LOXL2'nin, hücre adezyonunu sağlayan E-cadherin ekspresyonunu azalttığı ve çeşitli kanserlerde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) desteklediği gösterilmiştir. GATA6'nın ise PDAK'ın kötü prognozlu ve kemoterapiye dirençli olduğu bilinen bazal benzeri alt türünde, düşük ekspresyon gösterdiği ve bu özelliği ile klasik PDAK'den ayırt edilebileceği düşünülmektedir.

Biz, bu çalışmada pankreas adenokarsinomlarında başta tümör tomurcuklanması olmak üzere literatürde EMT ile ilişkili olduğu düşünülen morfolojik bulguların, tümör biyolojik davranışını predikte etmedeki rolünü ve EMT'nin regülasyonunda rol oynayan LOXL2 ekspresyonun bu morfolojiler ve prognozla ilişkisini araştırmayı planladık. Buna ek olarak in-silico yöntemlerle PDAC 'da GATA-6 alterasyonlarında görülen EMT ilişkili gen değişikliklerini araştırarak; EMT yolaklarının gelişimsel süreçlerini aydınlatmayı hedeflemekteyiz.

Bu çalışmada 2011-2021 yılları arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Pankreatik Duktal adenokarsinom (PDAK) tanısı almış 100 olguya ait belirlenen tümörlü doku kesitlerinde, patolojik parametreler değerlendirilmiş, klinik parametreler kayıt altına alınmıştır. İmmünohistokimyasal olarak Keratin, Vimentin, E-kadherin, LOXL2 ekspresyonu incelenmiş, elde edilen bulguların prognostik faktörlerle ilişkisi araştırılmıştır. Cbioportal.org sitesindeki erişime açık veri tabanlarından PDAK'lı olgulardaki GATA6 kopya sayısı değişiklikleri tespit edilmiş, ilişkili olduğu genler ve mRNA ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Morfolojik parametrelerden tümör tomurcuklanması (TT), tomurcuklanmadan büyük hücre grupları (TBHG), mezenkimal fenotip (MF) ve nekroz sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur ve birlikte değerlendirildiğinde EMT'yi yansıtan bulgulardır ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). Nekroz varlığı hem genel sağkalım hem de hastalıksız sağkalım açısından bağımsız negatif prognostik faktör olarak saptanmıştır ($p=0.023$, $p=0.015$). Diferansiasyon derecesi yüksek (log rank. $p=0.002$), cerrahi sınırı pozitif (log rank, $p<0.001$), lenfovasküler invazyonu olan ($p=0.037$) ve E-Cadherin kaybı ($p=0.028$) görülen olgularda sağkalım süresinin daha kısa olduğu saptanmıştır. LOXL2 epitelyal ve stromal boyanması sağ kalımla ilişkili bulunmamıştır. Tümörde vimentin pozitifliği ve LOXL2 stromal boyanması ile pT evresi arasında anlamlı ilişki vardır ve pozitif tümörlerin pT evresinin daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0.027$, $p=0.011$). GATA6 kopya sayısı değişiklikleri insiliko olarak yapılan araştırmada 916 hastanın 52 (%6)'sinde görülmüştür. Kopya sayısı artışı ile ilişkili 313 gen izlenmiş bunlardan 4'ü (ROCK1, RALBP1, LINC00668, GRB2) EMT ilişkili yollarda görev almaktadır. Log2 oranı 1'in üstünde olan FEG(farklı eksprese edilen genler)'lerde yapılan yolak ve ontolojik zenginleştirme analizinde, "pankreas kanserinde klasik ve bazal alt tiplendirme"; biyolojik süreç ise "epitelyal tabakanın korunması" istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

İlgili 4 morfolojik bulgunun birlikte değerlendirilmesinin EMT süreçlerini yansıttığı düşünülmektedir. PDAK'ta nekroz bağımsız negatif prognostik faktördür ve patoloji raporlarında belirtilmesi önemlidir. LOXL2'nin EMT ve sağ kalımla ilişkisi bu çalışmada görülmemiştir. GATA6 ekspresyonu 18q kazancıyla ilişkilidir, çeşitli mRNA ekspresyonları ve gen değişiklikleri aracılığıyla EMT süreçlerini düzenlemektedir.

SUMMARY

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF GATA6 AND LOXL2 EXPRESSION WITH EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION-ASSOCIATED MORPHOLOGY IN PANCREATIC CANCERS

Dr. Elif Yumuk

Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, Izmir

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most common malignancies globally and represents an aggressive disease with a poor prognosis, poorly effective treatment options, and a lack of early detection methods. Epithelial-mesenchymal transition (EMT), as shown in studies, significantly influences the biological behavior of pancreatic cancer. EMT is a process where tumor cells differentiate from the parent tumor by transforming into a mesenchymal phenotype through the activation of transcription factors. During EMT, cells acquire different morphological and immunophenotypic characteristics by losing specific epithelial markers (keratin) and gaining mesenchymal markers (vimentin). Additionally, the loss of adhesion observed with the loss of E-cadherin expression in tumor cells, referred to as tumor budding, and the observation of individual cells or small groups of fewer than 5 cells at the infiltrative edge of the tumor, separated from the main tumor mass, are considered indicators of EMT. One of the regulatory mechanisms in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process is the GATA6 transcription factor, and the LOX-like 2 (LOXL2) enzyme. Several studies have shown that LOXL2 reduces E-cadherin expression, which provides cell adhesion, and promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) in various cancers. GATA6 is believed to exhibit low expression in the basal-like subtype of PDAC, known for its poor prognosis and resistance to chemotherapy, distinguishing it from classic PDAC.

In this study, we aim to investigate the role of morphological findings, primarily tumor budding in pancreatic adenocarcinomas, which are believed to be associated with EMT, in predicting tumor biological behavior and the relationship between LOXL2 expression, which plays a role in the regulation of EMT, and these morphologies and

prognosis. additionally, by exploring EMT-related gene changes in GATA-6 alterations in PDAC using in-silico methods, we aim to shed light on the developmental processes of EMT pathways.

In this study, pathological parameters were assessed, and clinical parameters were recorded in tumor tissue sections from 100 patients diagnosed with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) at Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology between 2011 and 2021. Immunohistochemical analysis was performed on Keratin, Vimentin, E-cadherin, and LOXL2 expressions, and their relationship with prognostic factors was investigated. GATA6 copy number changes in PDAC patients were determined from publicly available databases on Cbioportal.org, and associated genes and mRNA expressions were evaluated.

Morphological parameters such as tumor budding (TB), TBHG, MF, and necrosis are related to survival and, when evaluated together, reflect EMT-related findings ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). The presence of necrosis was found to be an independent negative prognostic factor for both overall survival and disease-free survival ($p = 0.023$, $p = 0.015$). Patients with a high degree of differentiation (log rank, $p = 0.002$), positive surgical margins (log rank, $p < 0.001$), lymphovascular invasion ($p = 0.037$), and loss of E-cadherin ($p = 0.028$) had shorter survival. LOXL2 epithelial and stromal staining did not show an association with survival. The positivity of vimentin and the stromal staining of LOXL2 in the tumor showed a significant correlation with the pT stage. It was observed that positive tumors had lower pT stages ($p = 0.027$, $p = 0.011$). GATA6 copy number changes were observed in 52 (6%) out of 916 patients. 313 genes were associated with copy number increase, of which 4 (ROCK1, RALBP1, LINC00668, GRB2) are involved in EMT-related pathways. In pathway and ontological enrichment analysis conducted in FEGs with a log2 ratio greater than 1, "pancreatic cancer classic and basal subtype" was statistically significant in biological processes as "epithelial layer preservation."

The simultaneous evaluation of these four morphologic findings is believed to reflect EMT processes. Necrosis is a negative independent factor and therefore it is important to mention it in pathology reports. This study did not observe an association between LOXL2 and EMT or survival. GATA6 expression is linked to 18q gain and regulates EMT processes through various mRNA expressions and gene alterations.

1. GİRİŞ AMAÇ

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK), dünyada en sık görülen malignitelerden biridir ve 5 yıllık sağkalım oranı %5' ten azdır. Çoğu PDAK hastası tanı konulmadan önce belirti göstermez ve bu da tedavinin gecikmesine ve sadece %20' sine radikal küratif rezeksiyon uygulanabilmesine neden olur. PDAK kötü prognoz, zayıf etkili tedavi seçenekleri ve erken teşhis yöntemleri eksikliği ile giden agresif bir hastalıktır. Bu nedenle, PDAK'da erken tanı ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi önemlidir¹.

Pankreas kanserinin moleküler patogenezi, kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını anlamak, prognozunu tayini ve pankreas kanserine karşı hedefli tedavilerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. PDAK'ın genetik ve fenotipik heterojenliği etkili tedavilerin belirlenmesini karmaşık hale getirmiştir. Çalışmalarda pankreas kanserinin biyolojik davranışında epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'in etkili olduğu öne sürülmektedir. EMT, tümör hücrelerinin transkripsiyon faktörlerinin aktive olması ve protein ekspresyon değişimleri ile tümör hücrelerinin mezenkimal fenotipe dönüşerek ana tümörden ayrıldığı bir süreci tanımlar. Solid kanser hücreleri, epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe geçiş ile invaziv özelliklerini artırır ve metastaza eğilim gösterirler. EMT süreci, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, sinyal yolları ve tümör mikroçevresinden oluşan ve kanser kök hücre (CSC) benzeri özellikler sergileyen karmaşık bir sistem tarafından düzenlenir. PDAK'da, EMT'nin kanser hücrelerinin biyolojik davranışları ve klinik tedavi üzerindeki etkisi tam bilinmese de yapılan çalışmalarda EMT inhibisyonu ve kemoterapinin birlikte uygulanmasının tedaviye katkı sağlayabileceği belirtilmektedir².

EMT'nin hücrelere farklı morfolojik ve immüno-fenotipik özellikler kazandırdığı bilinmektedir. Tümör hücrelerindeki mezenkimal farklılaşmalar hücrelerin şekilsel ve sitoplazmik özelliklerinde değişim yanı sıra spesifik epitelyal belirteçlerin kaybı (keratin) ve mezenkimal belirteçlerin (vimentin) kazanılmasıyla gösterilebilir. Ayrıca tümör hücrelerinde, E-cadherin ekspresyon kaybı ile gözlenen adezyon kaybı, mezenkimal belirteçlerin (N-cadherin ve fibronektin gibi) edinilmesi ve artan hücre motilitesi de gözlemlenir³. Bununla birlikte, tümörün infiltratif kenarında hücrelerin tek tek ya da 5 hücreden az küçük gruplar oluşturarak ana tümör kütesinden ayrı, saçılmış olarak

gözlemlenmesi, tümör tomurcuklanması olarak adlandırılmakta ve tümörde bu bulgunun EMT'nin bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Tümör tomurcuklanması, invazyon ve metastaz yapma özelliği olan tümör hücrelerinin agresif bir özelliği olarak tanımlanmaktadır⁴. Yapılan çalışmalar, tümör tomurcuklarında, WNT sinyal yolağının aktivasyonu dahil olmak üzere EMT'de hücrelerde gerçekleşen değişikliklere benzer değişikliklerin bulunduğunu göstermiştir⁵. Tümör tomurcuklarında, adezyon molekülü E-Cadherin'in membranöz ekspresyonunun kaybı da gözlenmektedir. EMT süreci, tümör hücresinin mezenkimal bir fenotipe dönüşerek, apoptozdan kaçmasına, invazyon ve metastaz yeteneğinin artmasına neden olmaktadır.

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde çok sayıda düzenleyici mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan biri olan LOX-like 2 (LOXL2) enzimi, beş homolog, prototipik LOX ve dört farklı LOX benzeri protein (LOXL1-4) içeren lisil oksidaz (LOX) ailesinin bir üyesidir. LOXL2, lisil oksidaz aktivitesi aracılığıyla kollajen ve elastin bileşenlerinin çapraz bağlanmasını katalize ederek ekstraselüler matriksin (ECM) yapısını stabilize eden ve böylece doku bütünlüğünü korumaya çalışan bir enzimdir⁶. Pek çok çalışmada LOXL2'nin, hücre adezyonunu sağlayan E-cadherin ekspresyonunu azalttığı ve çeşitli kanserlerde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) desteklediği gösterilmiştir. Bu mekanizmalar nedeniyle LOXL2'nin EMT'nin güçlü bir düzenleyicisi olduğu⁷ ve pankreas kanserinde önemli bir prognostik faktör olabileceği öne sürülmektedir⁸. Çalışmalarda LOXL2 ekspresyonu hem kanser hücrelerinde hem de kanser hücrelerini çevreleyen stromada izlenmiştir. Kasashima ve ark tarafından yapılan çalışmada stromal hücreler tarafından salınan LOXL2'nin mide kanseri invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir.⁹ LOXL2'nin, hem EMT'yi destekleyen, hem de desmoplastik stromal disfonksiyon ile invazyon ve metastazı artırarak, ilaç etkisini azaltabilecek etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir⁸. Bu nedenle, LOXL2 inhibisyonunun, kanser hücresi canlılığını ve kemoterapiye direnci azaltarak hastaların sağ kalımını arttırabileceği ve terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği ön görülmektedir¹⁰.

GATA-6, pankreas dokusu gelişiminde düzenleyici rolleri bulunan GATA transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir¹¹. GATA proteinleri, kanonik DNA motifine (G/A)GATA(A/T)¹² bağlanan korunmuş bir çinko parmak dizisini ifade eder ve temel olarak iki alt grupta incelenir. GATA1/2/3, hematopoetik hücre gruplarında eksprese edilirken, GATA4/5/6 ise mezoderm ve endoderm kökenli organlarda eksprese edilir¹³.

GATA-6'nın özellikle kalp, gastrointestinal sistem ve pankreasın embriyolojik gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir ^{14, 15}. Bununla birlikte birçok çalışmada GATA-6'nın çeşitli doku tiplerinde tümörögenез mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ^{16,17,18,19}. Pankreas karsinomunun güncel çalışmalarda kötü prognozlu ve kemoterapiye dirençli olduğu bilinen bazal benzeri alt türünde, GATA6 ekspresyonunun düşük olduğu ve bu özelliği ile klasik PDAK'den ayırt edilebileceği öne sürülmüştür ^{20,21}. Ayrıca pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK) hücrelerinde ve ksenogreftlerde GATA-6'nın kopya sayısı artışı da çalışmalarda gösterilmiştir ^{20, 22, 23}. GATA-6 hem doğrudan hem de dolaylı bir mekanizma ile epitel ve mezenkimal transkripsiyon süreçlerini kontrol eden ve pankreas kanseri hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi (EMT) önleyen tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörüdür. Bunu hem epitelyal genlerin aktivasyonu hem de mezenkimal genlerin represyonunu içeren bir mekanizma ile yapar. GATA-6 bu özelliklere sahip ilk EMT düzenleyicisi olarak bilinmektedir ²⁴.

Tao Peng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ise LOXL2' nin anjiyogenez ve tümör büyümesini teşvik etmek için GATA-6 ile etkileşime girdiği ve GATA-6/LOXL2 kompleksinin, salgılanan VEGFA'nın ekspresyon seviyelerini düzenleyerek kolanjiyokarsinomların gelişiminde rol oynayan yeni bir anjiyogenez mekanizması olduğunu öne sürmüştür ²⁵.

Biz, bu çalışmada pankreas adenokarsinomlarında başta TT olmak üzere literatürde EMT ile ilişkili olduğu öne sürülen morfolojik bulguların tümör biyolojik davranışını predikte etmedeki rolünü araştırmayı ayrıca, EMT'nin regülasyonunda rol oynayan LOXL2 ekspresyonunun bu morfolojiler ve prognozla ilişkisini araştırmayı planladık. Buna ek olarak in-silico yöntemlerle yine PDAK'ta GATA-6'nın EMT'yi düzenlemedeki rolünü ve GATA-6 alterasyonlarında görülen EMT ilişkili gen değişikliklerini araştırarak; EMT yolaklarının gelişimsel süreçlerini aydınlatmayı, kanser metastazını önlemek için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilebilmesinde ve pankreas kanserlerinin sınıflandırmasında yardımcı bulgular bulmayı hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas hakkında genel bilgiler

2.1.1 Anatomi

Pankreas, retroperitoneal yerleşimli, ortalama 15-20 cm uzunluğunda, 40-180 gram ağırlığında bir sindirim sistemi organıdır. Batın arka duvarında L1 ve L2 vertebrae arasında uzanır. Pankreas, baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere dört ana bölümden oluşur. Baş kısmı, alt vena kava ve renal venin üstünde konumlanmıştır ve duodenumun C şeklindeki halkası ile çevrelenmiştir. Pankreasın kuyruğu, dalak hilusuna kadar uzanır. Önemli anatomik yapılar ve organlar ile yakından ilişkilidir. Anteriorunda mide, transvers kolon; posteriorunda aorta, superior mezenterik arter/ven, portal ven, vena cava inferior gibi önemli damar yapıları; medialinde duodenum ve ana safra kanalı, lateralinde ise dalak bulunmaktadır. Pankreas içerisinde kuyruktan başa doğru ana pankreatik kanal (Wirsung kanalı) uzanır. Wirsung kanalı, duodenum duvarı dışında veya duodenum duvarı içinde koledok ile birleşerek veya tamamen koledoktan ayrı olmak üzere 3 farklı şekilde duodenumun ampulla bölgesine açılmaktadır.

2.1.2 Embriyoloji ve Histoloji

Pankreas, gestasyonel dönemin 4.-5. haftasında, ön barsağın distalindeki “ventral ve dorsal tomurcuk” olarak isimlendirilen iki endodermal tomurcuktan köken almaktadır²⁶. Ventral ve dorsal taslaklar, intrauterin hayatın 7. haftasında birleşirler. Dorsal taslaktan pankreas başının süperior-posterior kısmı, gövdesi ve kuyruğu; ventral taslaktan da uncinat proçes, başın inferior-anterior kısmı gelişir.

Pankreas enzimleri, iki ana kanal aracılığıyla boşaltılır: Wirsung kanalı (büyük pankreas kanalı) ve Santorini kanalı (küçük pankreas kanalı). Ventral kanal, ana pankreatik kanalın başlangıcını oluşturur ve ampulla vateri aracılığıyla duodenuma açılır. Dorsal kanal ise, ana kanalların yanı sıra Santorini'nin aksesuar kanalının bir parçasını oluşturur. Genellikle Santorini kanalı da ampulla vateriden boşalır, ancak bazı insanlarda bağımsız olarak ince bağırsağa dökülebilir, bu durum yaklaşık olarak insanların %5'inde görülmektedir²⁷.

Pankreasın dış salgı kısmı, parotis bezi ile benzerlik gösteren bileşik asiner bezlerdir. Pankreas, mikroskopik olarak 1-10 mm boyutlarındaki lobüllerden oluşmaktadır. Bu lobüller asinus ve duktus hücreleri ile Langerhans adacıkları tarafından oluşturulur. Lobüller, dar interlobüler bağ dokusu ile ayrılır ve damarlar ile sınırları içermektedir.

Ekzokrin sekreter komponentin esas kısmını oluşturan asinüsler, pankreas parankiminin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Asinuslar, sferik bir düzen içinde bulunan poligonal hücrelerden oluşur. Bu hücreler yuvarlak nükleusa, granüler eozinofilik sitoplazmaya ve zimojen granüllere sahiptir. Duktal sistem sentroasiner hücreler, interkalar duktus, intralobüler duktus, interlober duktus ve ana duktustan oluşur ve asiner hücre sekresyonunun duodenuma taşınmasını sağlamaktadır. Duktal hücreler myoepitelyal veya bazal hücre içermez. Pankreas, ince bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir ve bu kapsül, organı lobüllere bölen bağ dokusu bölmeleri ile içeriye doğru girer. Asinüsler, ince bir retiküler lif kılıfı ve bazal lamina ile desteklenir. Ayrıca, pankreasta salgılama işlemi için gereken zengin bir kapiller ağ bulunmaktadır^{28,29}.

2.1.3. Fizyoloji

Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonlara sahip bir organdır. Endokrin özellikleri, yaklaşık 3 milyon Langerhans adası hücresi tarafından sağlanır ve bu hücreler dört ana grup içerir: glukagon üreten α (alfa) hücreleri, insülin üreten β (beta) hücreleri, somatostatin üreten δ (delta) hücreleri ve pankreatik polipeptid üreten γ (gamma) veya PP hücreleri. İnsülin kan glukoz seviyelerini düşürürken, glukagon kan glukoz seviyelerini artırarak glukoz metabolizmasını düzenlemektedir. Somatostatin ise α ve β hücre fonksiyonlarını azaltarak bu metabolizmaya katkı sağlamaktadır. Ekzokrin özellikleri ile pankreas, karbonhidrat, protein ve yağların sindirimine yardımcı olur. Ekzokrin fonksiyon, gastrin, kolesistokinin ve sekretin hormonları tarafından kontrol edilir ve sindirim enzimlerini salgılar. Ayrıca, bikarbonat salgısı ile mideden duodenuma geçen asitli kimusun nötralize olmasına yardımcı olmaktadır.

2.1.4 Pankreasın arteriyel ve venöz dolaşımı

Pankreasın beslenmesi, splenik arterin dalları, superior mezenterik arter (SMA) ve ortak hepatik arter tarafından sağlanmaktadır. Pankreasın baş bölgesi, gastroduodenal arter ve alt pankreatikoduodenal arter (PDA) tarafından beslenirken, gövde ve kuyruk bölgesi splenik arter ve dalları tarafından beslenir. Baş bölgesinin venöz drenajı, superior mezenterik vene (SMV), gövde ile boyun bölgesinin drenajı ise splenik vene gerçekleşir. Bu venlerin birleşmesi sonucunda portal ven oluşmaktadır²⁷.

2.1.5 Lenfatik drenaj ve sinirler

Pankreasın lenfatik drenajı, pankreatikoduodenal, hepatoduodenal ligaman, prepilorik, postpilorik, mezokolik, hepatik ve splenik arter çevresindeki lenf nodüllerinden başlayarak çölyak, superior mezenterik, paraaortik ve aortokaval lenf nodlarına doğru ilerlemektedir.

Pankreas, karmaşık bir sinir ağına sahiptir. Sempatik ve parasempatik lifler, pankreasın asiner hücrelerine dağılır. Parasempatik lifler, vagustan sağlanır ve sekretomotor işlev görür. Sempatik sinirler ise T6-T10 torasik splanknik sinirler ve çölyak plexusu yoluyla pankreası innerve eder^{27,30}. Pankreasta afferent duyu sinirleri çok sayıdadır. Bu yüzden ilerlemiş pankreas kanseri ile akut ve kronik pankreatitte şiddetli ağrı ortaya çıkmaktadır.

2.2 Pankreas Duktal Adenokarsinomu: Genel Bilgiler

2.2.1 Prekürsör Lezyonlar

Prekürsör lezyonlardan, mikroskopik düzeyde olan pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) yetişkinlerin önemli bir kısmında rastlantısal görülmektedir. Makroskopik prekürsör neoplazmlar; IPMN (intraduktal papiller müsinöz neoplazm), intraduktal onkositik papiller neoplazm, intraduktal tübülopapiller neoplazm ve musinöz kistik neoplazmlardır. Tüm bu prekürsörler son konsensusa göre yüksek dereceli ve düşük dereceli displazi olarak gruplandırılmıştır. Yüksek dereceli kategorisi, morfolojik displazi spektrumunun en şiddetli üçte birini yansıtır, bu sebeple önceki sınıflamada

orta dereceli displazi olarak kabul edilen PanIN-2, yeni sınıflamada düşük dereceli displazi kategorisine dahil edilmiştir³¹.

2.2.1.1 Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi (Pan IN)

PanIN, intralobüler pankreas duktuslarından köken almaktadır. Genellikle 5 mm'den daha küçük papiller ya da flat lezyonlardır. Bu nedenle klinik bulgu vermemekte ve makroskopik veya radyolojik görüntüleme ile tespit edilememektedir. Klinik önemi olanlar, yüksek dereceli PanIN lezyonlarıdır. Bunlar karsinoma in situ tipi lezyonlar olarak kabul edilir ve invaziv duktal adenokarsinoma ilerleyebilir. Değişken mukus üretimi, epitel türleri ve sitolojik-yapısal atipi dereceleri ile karakterizedir³¹.

2.2.1.2 İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi (IPMN)

Ana pankreatik kanal veya dallarından kaynaklanan, genellikle 5 mm'den büyük, müsin üreten epitelyal hücrelerden oluşan, çoğunlukla papiller nadiren flat özellikte ve çeşitli sitolojik ve yapısal anormallikler içeren, makroskopik olarak gözlenebilen neoplazilerdir³². Gastrik, intestinal ve pankreatobiliyer epitel içeren alt tipleri vardır.

2.2.1.3 İntraduktal Onkositik Papiller Müsinöz Neoplazm

IPMN'den farklı mutasyonlar içeren ayrı bir antite olarak tanımlanmıştır. Dilate pankreas kanalları içinde büyüyen, eozinofilik granüler sitoplazmalı, oval iri nükleuslu hücrelerden oluşan, ekzofitik nodüler projeksiyonlar oluşturan büyük kısmı kistik bir epitelyal neoplazmdır.

2.2.1.4 İntraduktal Tubulopapiller Neoplazm

Mukus üretmeyen, yüksek derecede displazi ve duktal farklılaşma ile karakterize intraduktal, çoğunlukla sırt sıra vermiş tubuler bezlerden oluşan bir epitelyal neoplazmdır. IPMN'in pankreatobiliyer tipi ile karışabilir. Müsin üretimi, MUC5A ekspresyonu ve displazi spektrumunun varlığı IPMN lehine bulgulardır.³³

2.2.1.5 Müsinöz Kistik Neoplazi (MKN)

Pankreas duktal sistemi ile ilişkisiz, kolumnar ve müsin üreten epitel ile döşeli, hormon reseptörlerini eksprese eden ovarian tipte subepitelyal stroma ile karakterize, kistik neoplazilerdir. IPMN'lerin aksine, MKN'ler tipik olarak kadınlarda görülür, çoğunlukla pankreasın kuyruğunda veya gövdesinde bulunur³⁴.

2.2.2 Pankreas duktal adenokarsinomunda Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), kötü prognoza sahip ve insidansı artan bir kanser türüdür³⁵. 15 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %7'dir ve dünya çapında kanserden ölüm nedenleri arasında yedinci sıradadır³⁶. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise kansere bağlı ölüm nedenlerinde dördüncü sırada ve sindirim sistemi kanserleri arasında kolorektal kanserlerden sonra ikinci sıradadır^{37,38}. Pankreas kanseri, genellikle 55 yaşından önce tanı almaz ve en yüksek insidans 70 yaşın üzerindeki bireylerde görülmektedir. İnsidans, yaşla birlikte artmaktadır. Erkeklerde 100.000 kişide 5.5, kadınlarda ise 100.000 kişide 4.0 olarak rapor edilmiştir³⁶.

Pankreas duktal adenokarsinomu gelişimi için risk faktörleri arasında tütün kullanımı, aile öyküsü, genetik bozukluklar, diyabet, kronik pankreatit ve intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar yer almaktadır. Hastalık, BRCA1/2, PALB2, CDKN2A dahil olmak üzere genetik mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir³⁹. BRCA mutasyonu bulunduran ailesel meme kanserinde PDAK gelişme riski 3,5-10 kat artmaktadır. Ek olarak herediter non-polipozis kolorektal kanser (Lynch sendromu), ailesel adenomatöz polipozis (FAP), Peutz-Jeghers sendromu ve ailesel atipik multipl mol melanom sendromu (FAMMM) pankreas kanseri riskinin arttığı genetik sendromlardandır³⁹.

2.2.3 Pankreas duktal adenokarsinomunda Makroskopik Özellikler

Pankreas duktal adenokarsinomu, pankreasın duktus epitelinden gelişir ve vakaların yaklaşık üçte ikisi pankreasın baş bölümünde, geri kalan üçte biri ise gövde ve kuyruk bölgesinde ortaya çıkmaktadır. Genellikle soliterdir, ancak bazı vakalarda birden fazla tümör (%20'si) görülebilmektedir. Makroskopik olarak normal pankreas parankimini ortadan kaldıran, sert, sklerotik, sınırları seçilemeyen gri sarı renkte

kitlelerdir ve kronik pankreatitten ayrımı zordur. Makroskopik hemoraji ve nekroz genelde belirgin değildir nadiren kistik dejenerasyon görülebilmektedir. Prekürsör lezyonlar varlığında kitle içinde ya da komşuluğunda kistik alanlar gözlenebilir. Bu tümörlerin bir kısmı duodenum duvarını direkt olarak invaze eder ve ekstrapankreatik yayılımı olduğunda tümörün primer odağını belirlemek makroskopik olarak zorlaşmaktadır⁴⁰.

2.2.4. Pankreas duktal adenokarsinomunda Mikroskopik Özellikler

PDAK, iyi, orta ve kötü diferansiye olarak derecelendirilmektedir. Duktal adenokarsinomun histolojik derecesini glandüler diferansiyasyon, müsin sekresyonu, mitoz ve nükleer pleomorfizm belirlemektedir. Desmoplastik stroma, pleomorfizm, nükleol belirginliği ve seyrek mitoz özelliklerindendir. Hücrelerde polarite kaybı vardır. Genellikle serbest müsin eşliğinde tamamlanmamış duktus yapıları (abortif gland oluşumu) PDAK için karakteristiktir.

2.2.5 Tümör Stroması

PDAK'ın mortalitesi yüksek bir kanser türü olmasında; erken dönem semptomları ve belirleyicilerin eksikliği, küçük boyutlu tümörlerin bile uzak metastaz yapabilmelerini sağlayan agresif biyolojik özellikleri ve yoğun desmoplastik stroması etkili olmaktadır. Bu özellikler ilaç direnci ve kötü tedavi sonuçları ile ilişkilidir.

PDAK'ta stromayı oluşturan hücreler, kanserle ilişkili fibroblastlar (KİF), endotel hücreleri ve immun hücrelerdir. Pankreas yıldız hücreleri KİF'lerin bir alt kümesidir⁴¹. KİF'ler ve yıldız hücreleri çeşitli türde epidermal, mezenkimal progenitör hücrelerden köken alan, tümör stromasında önemli rolleri olan hücrelerdir⁴². KİF'ler, bir takım büyüme faktörlerinin Transform edici büyüme faktörü β (TGF- β), sonic hedgehog, tümör nekroz faktörü α (TNF- α), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve interleokinlerin (IL-1, IL-6, IL10) salınmasıyla aktive olmaktadır. Aktive KİF'ler, çeşitli büyüme faktörleri salgılar ve kollajen tip I ve III, fibronektin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanların artışına sebep olarak desmoplaziyi indüklemektedir. Artmış ekstrasellüler matriks (ECM) ve fibrozis doku vaskülarizasyonu baskılayarak hipoksiye neden olmaktadır⁴³. Sonuç olarak KİF'ler, kanser hücrelerinin düşük glikozlu ortamda

beslenme yeteneklerini artırır⁴⁴. Bu durum KİF'lerin EMT'nin, tümörün invazyon yeteneğine, anjiyogeneze ve metastaza katkıda bulunmasını sağlamaktadır^{45,46}. Buna karşılık, immunsupresif özellikte hücreler (düzenleyici T hücreleri (Treg), miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC) gibi) tümör baskılayıcı immün yanıtta görevli CD8+ T hücrelerini inhibe etmekte ve immünsüpresif bir tümör mikroortamı oluşturmaktadırlar. KİF'ler de bu mikroortamın oluşmasına katkıda bulunurlar. Bunun gibi çeşitli bağışıklık baskılayıcı mekanizmalar nedeniyle PDAK'ların sakin immuniteye sahip tümörler olduğu düşünülmekte ve antitümör bağışıklığını baskılayan kontrol noktalarına yönelik immunoterapiler ve stromaya yönelik çeşitli antifibrotik tedavi yöntemleri üzerinde hala çalışılmaktadır⁴⁷. Ancak desmoplastik stromayı hedef alan bazı klinik çalışmalarda sonuçlar alınamamakta ve fare modellerinde bir takım desmoplastik stroma miktarını azaltmaya yönelik tedavi stratejilerinin daha agresif tümörlere yol açtığı görülmektedir^{48,49}. Tümör stroma miktarının fazla olmasının mortaliteyi düşürdüğü ve koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmektedir⁵⁰. PDAK'taki mikroortam oldukça heterojendir ve stromanın bu kompleks yapısının tümörün agresifliğindeki rolü tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

2.2.6 Pankreas Duktal adenokarsinomu histolojik varyantları

Pankreas adenokarsinomunun histolojik varyantları; Adenoskuamöz karsinom, Kolloid karsinom (müsinöz non-kistik karsinom), Hepatoid karsinom, Medüller karsinom, Mikst asiner-duktal karsinom, Mikst asiner-nöroendokrin karsinom, Mikst asiner-nöroendokrin-duktal karsinom, Mikst duktal-nöroendokrin karsinom, Taşlı yüzük hücreli karsinom, Andifferansiye karsinom ve Osteoklast benzeri dev hücreler içeren andifferansiye karsinom ve Rabdomyoid fenotipte büyük hücreli karsinom'dur⁵¹.

2.2.7 İmmunhistokimyasal Bulgular

PDAK'lar normal pankreas duktus epitelinde olduğu gibi CK 7, CK 8, CK 18, CK19 ile pozitifdir. PDAK'yı diğer ekstrapankreatik adenokarsinomlardan (örn., Safra kanalı karsinomları) kesin olarak ayırabilecek bir immünohistokimyasal panel bulunmamaktadır. Ayrıca PDAK'larda MUC 1, MUC3, MUC 4, MUC 5AC, CEA, CA125, CA199 ve yarısı kadarında CK 4 ekspresyonu vardır. Bu belirleyicilerin büyük kısmı

kronik pankreatitte de eksprese edilmektedir. MUC6, PDAK'ların yaklaşık üçte birinde pozitifken CK 20 ve MUC 2 pozitifliği beklenmemektedir⁵². PDAK'lar genellikle vimentin ve nöroendokrin veya asiner belirleyiciler (tripsin, BCL10) ile boyanma göstermez. Karsinomların %55'inde SMAD4 (DPC4), %75'inde ise p16 (CDKN2A)'nın nükleer ekspresyonlarında kayıp görülmektedir. PDAK'ta p53 aşırı ekspresyonu veya tam kaybı(null) izlenmektedir ⁵³. Pozitif olduğu başka diğer belirteçler ise claudin 4, claudin 18 ve S100P' dir ⁵⁴.

2.2.8 Pankreas duktal adenokarsinomunda görülebilen mutasyonlar

Onkogenlerden KRAS (>%90), MYB, AKT, ERBB2; tümör supresör genlerden CDKN2A (p16), TP53, SMAD4 (DPC4), BRCA2, MAP2K4 (MKK4), STK11 (LKB1), TGFBR1 (ALK5), TGFBR2 ve DNA mismatch tamir genlerinden MSH2, MLH1'de mutasyonlar görülebilmektedir⁵⁵.

2.2.9 Pankreas duktal adenokarsinomu moleküler sınıflama önerileri

PDAK'ta moleküler alt tiplerin tanımlanmasının tedaviye yanıt almada büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Çeşitli araştırmalar, PDAK'ın biyolojik ve prognostik verilerini yansıtan tümör sınıflandırmaları önermekte ve moleküler alt tipleri meydana getirmeye çalışmaktadır. Bu sınıflandırmalardan literatürde en çok öne çıkan 4 çalışma vardır; 2011'de Collisson ve ark.⁵⁶ ile Moffitt ve ark.⁵⁷, 2015'te Bailey ve ark.⁵⁸ ve PDAC moleküler alt tiplmesi için genelde altın standart kabul edilen 2016'da Puleo ve ark.⁵⁹ (Tablo 1). Bu sınıflandırma modellerinin sağlamlığını değerlendiren birçok kontrol çalışması yapılmıştır. Kontrol çalışmalarından birinde Puleo ve ark.'nın alt tiplendirme şemasının, PDAK farklılıklarının anlaşılması için daha geniş bir spektrum sağladığı ve moleküler heterojenliğin büyük bir kısmını kapsadığı öne sürülmektedir. Collisson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada klasik tipte GATA-6 ekspresyonunun fazla olması, yarı mezenkimal tipte GATA-6'da kayıp ve mezenkimal genlerin aktivasyonu görülmektedir. Moffitt ve arkadaşlarının çalışmasında klasik ve bazal olmak üzere 2 alt tiplendirme bulunmakta ve klasik tipte GATA-6 aşırı ekspresyonundan, bazal tipte de yine benzer şekilde mezenkimal genlerin aktivasyonundan bahsedilmektedir. Bu 4 çalışma sentezlendiğinde prognoz açısından en güçlü farklılıklara sahip olan bazal ve

klasik iki ana sınıf olduğu ve diğerk tiplerin bunların alt sınıfları olabileceği ön gör÷lmektedir⁶⁰.

Bailey ve ark.	Pankreatik	Skuamöz	ADEX	İmmunojenik	
Collisson ve ark.	Klasik	Yarı mezenkimal	Ekzokrin benzeri		
Moffitt ve ark.	Klasik	Bazal			
Puleo ve ark.	Pür klasik	İmmun Klasik	Pür bazal benzeri	Desmoplastik	Stroması aktif

Tablo 1: PDAK farklı molek÷ler subtipler

2.2.10 Pankreas Tümörlerinin TNM Klasifikasyonu ve Evrelemesi

Pankreas ekzokrin tümörleri, tümör boyutu, lenf nodu durumu ve metastaz varlığına göre Amerikan Kanseri Ortak Komitesi (American Joint Committee on Cancer, AJCC) tarafından sınıflandırılır. 2017 yılına ait 8. Basım AJCC sınıflaması aşağıda yer almaktadır⁶¹.

T-Primer tümör:

pTX: Primer tümör değerlendirilemedi

pT0: Primer tümör bulgusu yok

pTis: Karsinoma in situ (panIN-3, yüksek dereceli displazi içeren İPMN, yüksek dereceli displazi içeren İTPN, yüksek dereceli displazi içeren Müsinöz kistik neoplazi dahil)

pT1: En büyük boyutu 2 cm ve daha küçük tümör

pT1a: En büyük boyutu 5 mm ve daha küçük tümör

pT1b: En büyük boyutu 10 mm'den küçük fakat 5 mm'den büyük tümör

pT1c: En büyük boyutu 20 mm'den küçük fakat 10 mm'den büyük tümör

pT2: En büyük boyutu 4 cm ve daha küçük fakat 2 cm'den büyük tümör

pT3: En büyük boyutu 4 cm'den büyük tümör

pT4: Çölyak aks, süperior mezenterik arter ve/veya ortak hepatik arteri invaze eden tümör

N-Bölgesel lenf nodları:

pNx: Bölgesel lenf nodu metastazı değerlendirilemedi

pN0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

pN1: 1-3 adet bölgesel lenf nodu metastazı var

pN2: 4 ve daha fazla sayıda bölgesel lenf nodu metastazı var

M-Uzak metastaz:

pM1: Uzak metastaz var

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Evre III	T4	Herhangi bir N	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 2: PDAK 'larda klinik TNM evrelemesi

2.3 Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

2.3.1 EMT Tanımı

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücrelerin epitelyal özelliklerinin aşığıya regülasyonu ile mezenkimal fenotip ve davranış kazandığı hücresel bir süreçtir. EMT, embriyogenez ve yetişkinlerde yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçler sırasında gereklidir, ancak fibrozis ve kanser gibi patolojik durumlarda anormal şekilde aktive olmaktadır. EMT, hücrelerin mikroçevreden (KİF'ler, immun hücreler vs) aldıkları birtakım sinyaller ile tetiklenir ardından gen ekspresyonları ve translasyon sonrası düzenleme mekanizmaları ile epitelyal özelliklerin baskılanması ve mezenkimal özelliklerin kazanılmasına yol açar. Tümörlerde EMT değışiklikleri sonucu hücrelerde fibroblast benzeri bir morfoloji yanı sıra tümör hücrelerinin mobilite ve invazyon yeteneklerinde artış görülür.

2.3.2 Epitel hücrelerinde apikal bazal polarite

Epitel hücreleri tipik olarak, güçlü hücre-hücre bağlantılarına(sıkı bağlantılar, yapışan bağlantılar ve desmozomlar gibi) sahip apikobazal polariteyi koruyan ve hareketliliği sınırlayan, sıkı bir şekilde birbirine bağlı çok hücreli katmanlar halinde dizilir⁶². Hücrelerdeki apikal-bazal polarite, hücre iskeletindeki ipliksi aktinin apikobazal polarizasyonu ve çevre organizasyonu ile oluşmaktadır. Sitokeratinler ana ara filamentlerdir⁴⁶. Buna karşılık, mezenkimal hücreler bu fonksiyonel epitelyal bağlantılara sahip değildir. Mezenkimal hücre iskeletindeki aktin lifleri ön- arka polarite (front-back polarity) göstermekte ve vimentin bazlı ara filamentler içermektedir. Ön- arka polarite, epitel hücrelerinin aksine mezenkimal hücrelerinin daha geniş ve uzun bir şekle sahip görünümüyle ilişkilidir⁶³. EMT sürecinde görülen apikal-bazal polaritenin kaybı ve ön-arka polaritenin kazanılması; hepatosit büyüme faktörü (HGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve onkogenik transformatasyon gibi büyüme faktörlerine/sitokinelere yanıt olarak gerçekleşen hücre organizasyonundaki değışikliklerlerdir. Hücre polaritesindeki bu değışim, apikal-bazal polariteyi düzenleyen anahtar bileşenlerin ekspresyon kaybının doğrudan bir sonucudur⁶⁴. EMT sürecindeki bir hücre tam bir epitelyal özellik kaybı ve tam bir mezenkimal özellik kazanımı göstermez bu ikisi arasında akıcı ve geri dönüşümlü formlarda kalır⁶⁵.

2.3.3 EMT patogenezinde yer alan moleküller

EMT sürecinde meydana gelen kompleks hücresel değişiklikler dizisi, birçok moleküler faktörün iş birliğini gerektirir. TGF- β , kanser patogenezinin ilerlemesi sırasında temel ve önemli EMT indükleyicisi olarak tanımlanır⁶⁶. TGF- β yolu ve bunun sonucunda ortaya çıkan inflamasyon EMT'de rol oynar². İnflamatuvar ortamın etkisiyle pankreas duktal adenokarsinomun prekürsör lezyonları olan asiner-duktal metaplazi ve PanIN lezyonlarında bulunan hücrelerin bir kısmı EMT sürecine tabi tutulur ve mikroçevre tarafından tetiklenen EMT aktivasyonu, kanser hücrelerinin erken invazyon ve yayılımını sağlamaktadır⁶⁷.

EMT sürecine katılım oranlarına göre moleküler faktörler 3 grupta ifade edilebilir; EMT'yi indükleyen sinyaller (ECM bileşenleri gibi), EMT transkripsiyon faktörleri (snai1, snai2, zeb1, zeb2, twist1 vs.) ve epitelyal mezenkimal hücre özelliklerini belirleyen EMT belirteçleridir (n-kadherin, e-kadherin, vimentin, beta catenin vs.)⁶⁵.

2.3.4 EMT ve Tümör Tomurcuklanması

EMT'nin erken evresinde, apikal-bazal polarite kaybı genellikle gözlemlenen ilk olaydır ve lateral membrandaki bağlantı noktalarında instabiliteye yol açmaktadır⁶⁸. Ardından bu hücreler hem epitel hem de mezenkimal hücreler tarafından indüklenen ekstrasellüler matriksi invaze etme ve hareket etme kabiliyetine sahip epitel hücrelerine evrilmektedirler. EMT sırasında epitel hücrelerinin köken aldıkları epitelden uzaklaşmak için sıklıkla bazal membranı aşmaları gerekmektedir. EMT sürecinde hücrelerin bu göçünü ara filamentlerin sitokeratinden vimentine geçişi kolaylaştırır. Hücre-hücre yapışma kaybının derecesine bağlı olarak, epitel hücreleri tek hücre olarak, mezenkimal bir şekilde veya toplu olarak göç edebilmekte, zayıflamış ancak hala çalışır durumda olan hücre-hücre etkileşimleri yoluyla birbirlerine bağlı olarak da kalabilmektedirler⁶⁵. Bu durumun morfolojik karşılığı; literatürde EMT ile ilişkisi gösterilmiş tümör tomurcuklanmasıdır⁴. Ek olarak, bu çalışmada subsellüler EMT değişikliklerinin morfolojik kanıtları olabileceğini düşündüğümüz ön arka polarite değişikliği gösteren, HE kesitlerde, iğsi/ mezenkimal fenotip kazanmış epitel hücreleri olarak gördüğümüz hücreler ve tomurcuklanmadan büyük (>5 hücre) hücre grupları da bu süreci yansıtabilecek morfolojik bulgular olarak araştırılmaya değer bulunmuştur.

Ayrıca EMT'yi indükleyen mikroçevrede görev alan intratümöral ve peritümöral lenfositler, EMT'nin başladığı prekürsör lezyon olan asiner duktal metaplazi, stroma miktarı ile EMT erken evresinde görülen apikal-bazal polarite kaybı bizim bu çalışmada araştırdığımız diğer morfolojik parametrelerdir. Bu parametreler ile tümörde EMT'yi öngörme ve morfomoleküler bir sınıflamaya da zemin hazırlama amacı güdülmektedir.

2.3.5 EMT ve İmmunhistokimyasal Belirteçler

İmmünohistokimya, EMT sürecine kanser epitelyal hücreleri ile stromal fibroblastlar arasındaki ayrımın yapılmasında ve EMT ilişkili kanser hücrelerinin mezenkimal belirteçleri kazanırken epitelyal belirteçleri kısmen kaybettiğini göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Çoğu çalışma, ara filamentler olan sitokeratin ve vimentinin ekspresyonlarını odak noktalarına almıştır. Meme tümörlerinde epitel hücrelerinin vimentin ekspresyonu kazanması, hastaların ameliyat sonrası hayatta kalma oranlarını düşürmüş ve keratin/vimentin ekspresyon oranının, tek başına vimentin ekspresyonuna göre daha kötü prognozlu olduğunu göstermiştir⁶⁹.

E-Cadherin, hücre bağlantılarının stabilitesi ve fonksiyonelliği için gereklidir. Hücre polaritesini ve doku bütünlüğünü koruyarak epitelyal fenotipin ana belirleyicisi olarak görev yapar. E-Cadherin kaybı, hem in vivo hem de akciğer, meme, kolorektal ve over kanseri dahil olmak üzere kanser hücre dizilerinde EMT'nin önemli bir bulgusu olarak tanımlanmaktadır^{70,71,72}. Hücre-hücre adezyonu kaybına sebep olan aşağı regülasyonu, hücrelerin tek tek ana tümör kitlesinden ayrılmasında ve karsinomun ilerlemesinde önemli bir özelliği temsil eder. E-Cadherin kaybı sıklıkla tümör hücrelerinin diferansiyasyon kaybı, invazyon yetenekleri ve erken dönemde metastaz görülmesi ile yakından ilişkilidir. E-Cadherin kaybı, çeşitli çalışmalarda tanımlanmış olup, pankreas ve diğer kanserlerde aşağı regülasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir⁷³.

Buna ilaveten çeşitli çalışmalar; EMT'nin pankreas kanserlerinin ilerlemesindeki rolünü destekleyen N-Cadherin, Salyangoz, Slug ve Twist, fibronektin ve vimentin gibi transkripsiyon faktörlerinin artan ekspresyonunu göstermiştir^{70,74,75}.

Özetle EMT epitelyal sitokeratinlerin mezenkimal ara filaman olan vimentin ile değiştirilmesi yoluyla hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi, E-Cadherin'in kısmi

baskılanması, N-Cadherin'in aktivasyonu ve matriks-metalloproteinazların yüksek aktivitesi nedeniyle epitel hücreleri arasındaki bağlantıların gevşetilmesini kapsayan transkripsiyonel değişikliklerin indüklediği bir dizi olaydır. Çalışmamızda epitel hücrelerinin hücre iskeleti değişikliklerini gözlemleyebilmek amacıyla E-Cadherin kaybı, keratin ve vimentin ekspresyonları değerlendirilecektir.

EMT sürecinde yer alan çok sayıda düzenleyiciden biri de LOXL2'dir. LOX-like 2 (LOXL2) enzimi, beş homolog, prototipik LOX ve dört farklı LOX benzeri protein (LOXL1-4) içeren lisil oksidaz (LOX) ailesinin bir üyesidir. LOXL2, lisil oksidaz aktivitesi aracılığıyla kollajen ve elastin bileşenlerinin çapraz bağlanmasını katalize ederek ekstraselüler matriksin (ECM) yapısını stabilize eden ve böylece doku bütünlüğünü korumaya çalışan bir enzimdir ⁶. Pek çok çalışmada LOXL2'nin, hücre adezyonunu sağlayan E-Cadherin ekspresyonunu azalttığı ve çeşitli kanserlerde EMT'yi desteklediği gösterilmiştir. Bu mekanizmalar nedeniyle LOXL2'nin EMT'nin güçlü bir düzenleyicisi olduğu ⁷ ve pankreas kanserinde önemli bir prognostik faktör olabileceği öne sürülmektedir ⁸. Literatürde, LOXL2'nin normal pankreas dokularıyla karşılaştırıldığında pankreas kanserinde en yüksek oranda ve spesifik olarak yukarı regüle edilen genlerden biri olduğu ve pankreas kanserli hastalarda metastatik hastalık ve ölüm için bağımsız bir belirteç olduğu gösterilmiştir⁶. LOXL2 ekspresyonu hem kanser hücrelerinde hem de kanser hücrelerini çevreleyen stromada izlenmiştir. Kasashima ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada stromal hücreler tarafından salınan LOXL2'nin mide kanseri invazyonunu arttırdığı görülmüştür.⁹ Başka bir çalışma intrahepatik kolanjiokarsinomlarda LOXL2 stromal ekspresyonunun kötü genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur⁷⁶. LOXL2'nin, hem EMT'yi destekleyen , hem de desmoplastik stromal disfonksiyon ile invazyon ve metastazı arttırarak, ilaç etkisini azaltabilecek etkiye sahip olduğu düşünülmektedir⁸. Bu nedenle, LOXL2 inhibisyonunun, kanser hücresi canlılığını ve kemoterapiye direnci azaltarak hastaların sağ kalımını arttırabileceği ve terapötik bir hedef olarak kullanılabileceği ön görülmektedir¹⁰. Serimizde LOXL2'nin EMT ilişkili epitel hücrelerindeki ekspresyonu ile desmoplastik stroma ve prognoz ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz stromal hücrelerdeki ekspresyonu incelenecektir.

PDAK gelişiminde, hastalığın karmaşıklığını ve heterojenliğini ortaya koyan önemli ilerlemeler kaydedilmekte ve sınıflandırmalar üzerinde çalışılmaktadır. PDAK'ın moleküler sınıflandırmalarında da bahsedildiği üzere transkripsiyonel modifikasyonlar

ve epigenetik analizler temel alındığında başlıca "Klasik" ve "bazal" olmak üzere iki ana fenotip ortaya çıkmaktadır. Bu alt tiplendirmelerin belirlenmesinde GATA-6 ekspresyonu önemli bir rol oynamaktadır. GATA-6, pankreas dokusu gelişiminde düzenleyici rolleri bulunan GATA transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir ¹¹. GATA proteinleri, kanonik DNA motifine (G/A)GATA(A/T) ¹² bağlanan korunmuş bir çinko parmak dizisini ifade eder ve temel olarak iki alt grupta incelenir. GATA1/2/3, hematopoetik hücre gruplarında eksprese edilirken, GATA4/5/6 ise mezoderm ve endoderm kökenli organlarda eksprese edilir¹³. GATA-6'nın özellikle kalp, gastrointestinal sistem ve pankreasın embriyolojik gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir ^{14,15}. Birçok çalışmada GATA-6'nın çeşitli doku tiplerinde tümörögenез mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{16,17,18,19}. PDAK'ın güncel moleküler sınıflamalarında bazal alt tipin kötü prognozlu ve kemoterapiye dirençli olduğu bilinmektedir ve değişen farklılaşma ve epitelden epitelyale (ET2) geçiş ile tutarlı bazal benzeri moleküler fenotipin kazanılmasıyla bağlantılı GATA-6 ekspresyonu bu tümörlerde kaybolur²⁴. Bu özellik ile klasik PDAK'den ayırt edilebileceği düşünülmektedir^{20,21}. Yine ilerlemiş pankreas kanserinin klinik seyrini değerlendiren bir çalışmada düşük GATA-6 immunhistokimyasal ekspresyonu görülen hastalarda daha kısa sağ kalım süreleri olduğu ve PDAK'ın klinik seyrini tahmin etmek için tek başına kullanılabilecek bir belirteç olduğuna yönelik güçlü kanıtlar sunulmaktadır⁷⁷. Ayrıca PDAK hücrelerinde ve ksenogreftlerde GATA-6'nın kopya sayısı artışı da çalışmalarda gösterilmiştir^{20,22,23}. Tao Peng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ise LOXL2'nin anjiyogenez ve tümör büyümesini teşvik etmek için GATA-6 ile etkileşime girdiği ve GATA-6/LOXL2 kompleksinin, salgılanan VEGFA'nın ekspresyon seviyelerini düzenleyerek kolanjiyokarsinomların gelişiminde rol oynayan yeni bir anjiyogenez mekanizması olduğunu göstermektedir ²⁵.

GATA-6 hem doğrudan hem de dolaylı bir mekanizma ile epitel ve mezenkimal transkripsiyon süreçlerini kontrol eden ve pankreas kanseri hücrelerinde EMT'yi önleyen tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörüdür. Bunu hem epitelyal genlerin aktivasyonu hem de mezenkimal genlerin represyonunu içeren bir mekanizma ile yapar. GATA-6 bu özelliklere sahip ilk EMT düzenleyicisi olarak bilinmektedir ²⁴.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Olgular

Çalışmamıza 2011-2021 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği'nde pankreas tümörü ön tanısı ile Kausch-Whipple Pankreatikoduodektomi operasyonu ya da Distal Pankreatektomi uygulanmış, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Pankreatik Duktal adenokarsinom (PDAK) tanısı almış ve hastanemiz Medikal Onkoloji Kliniğinde takip edilen 100 hasta dahil edilmiştir. Pankreas tümörü nedeniyle opere edilmiş hastaların patoloji raporları "Probel" hastane bilgi yönetim sistemi kayıtlarından taranmış ve çalışmaya dahil edilecek, PDAK tanılı olgular seçilmiştir.

Çalışmanın etik kurul onayı, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Bilimsel Çalışmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Hastalara ait kişisel bilgilerin gizli kalması koşulu ile hastane bilgi yönetim sistemi üzerinden verilerin kullanımı için Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Başhekimliği'nden izin alınmış ve klinik ve sağ kalım verileri, Genel Cerrahi Anabilim Dalı ve Medikal Onkoloji Bilim Dalı'ndan çalışmaya dahil olan hekimler tarafından düzenlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait Hematoksilen eozin boyalı lamlar patoloji arşivinden çıkarılmış ve bir patolog (EY) tarafından tekrar değerlendirilmiştir. Talep üzerine parafin blok ve/veya lamları hastalara iade edilen, bloklarında yeterli miktarda tümörü bulunmayan, doku takibi/fiksasyon artefaktı nedeniyle kesitleri teknik açıdan optimal olmayan, klinik verilerine ulaşılamayan olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Kesit ve boya kalitesi optimal olan, tümörüne ait standart sayıda kesiti bulunan 100 adet olgu seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 100 hastanın yaşı, cinsiyeti, uygulanan operasyonun türü, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, tümör diferansiyasyonu, tümör evresi (pT), lenf nodu evresi (pN), cerrahi sınır durumu, perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon varlığı, hastane bilgi yönetim sistemi aracılığı ile patoloji raporlarından temin edilmiştir. Tüm tümörler AJCC 8. baskı TNM evreleme sistemine göre yeniden evrelenmiştir. Hastaların tedavi durumu, nüks durumu, nüks tarihi ve sağ kalım verileri Medikal Onkoloji kayıtlarından, hastane bilgi yönetim sistemi ve ulusal nüfus kayıt sistemi üzerinden elde edilmiştir.

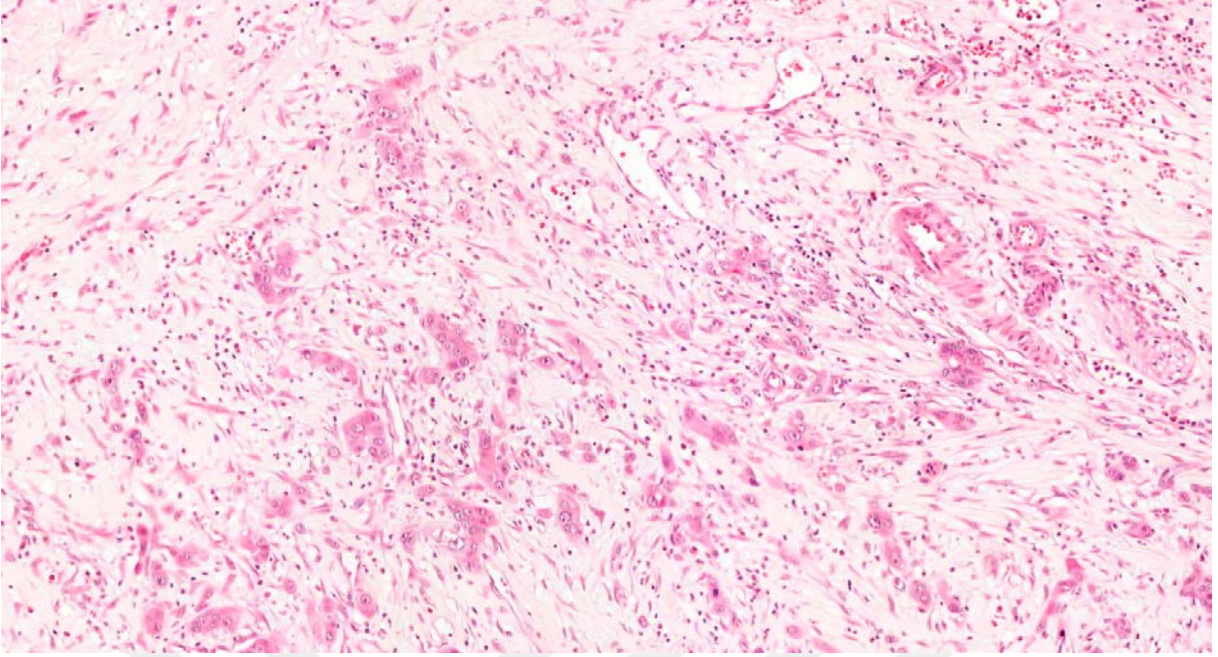
3.2 Histopatolojik Değerlendirme

Seçilmiş 100 olguya ait Hematoksilen-Eozin (HE) boyalı tümör kesitleri, 2 patolog (ÖS,EY) tarafından ışık mikroskopunda, literatürde epitelial mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili bulunduğu rapor edilen; tümör tomurcuklanması, mezenkimal fenotip (Front-back polarity) ve Apikal-Bazal Hücre Polarite Kaybı parametreleri ile histopatolojik incelemede rutin olarak değerlendirilmeyen ancak literatür taraması eşliğinde EMT ile ilişkili olabilecek tümör tomurcuklanması kriterlerine uymayan ancak gland oluşturmamış tümör hücre toplulukları (>5 hücre), inkomplet gland görünümü ya da prognostik açıdan anlamlı olabileceği düşünülen, intratümöral ve peritümöral lenfosittik yanıt, tümör stroması miktarı, tümör nekrozu varlığı ve asiner duktal metaplazi gibi morfolojik parametreler açısından aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir.

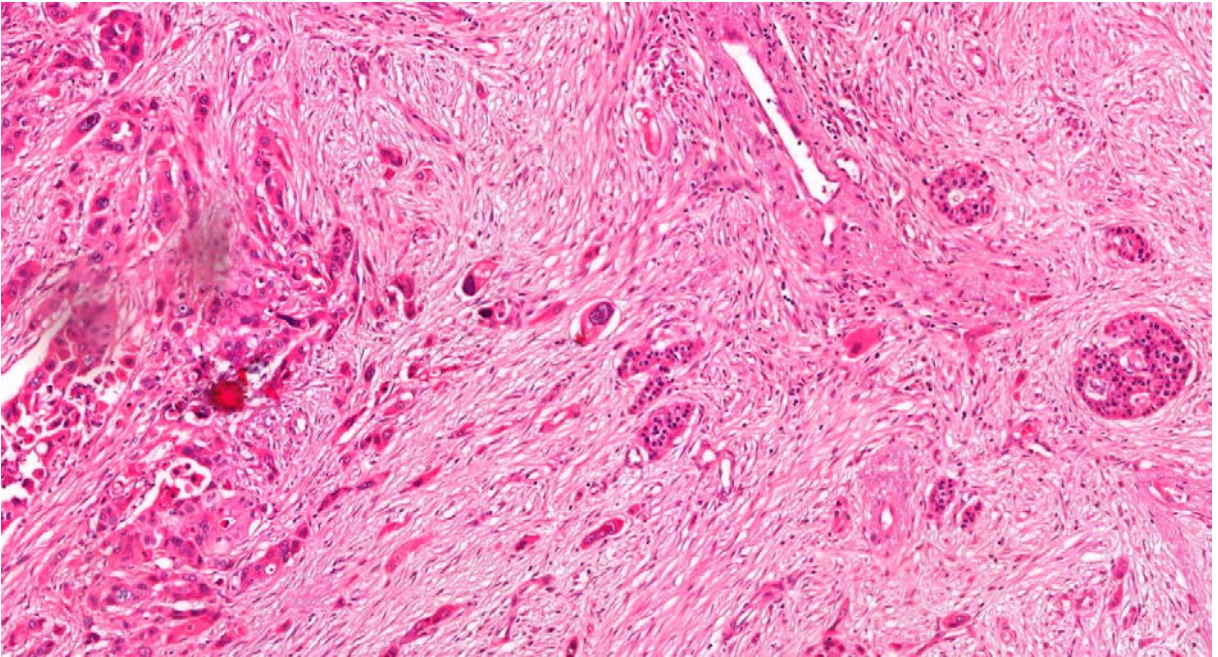
Bulgular PDAK standard prognostik parametreleri ve sağkalım verileri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.2.1 Tümör tomurcuklanması (TT)

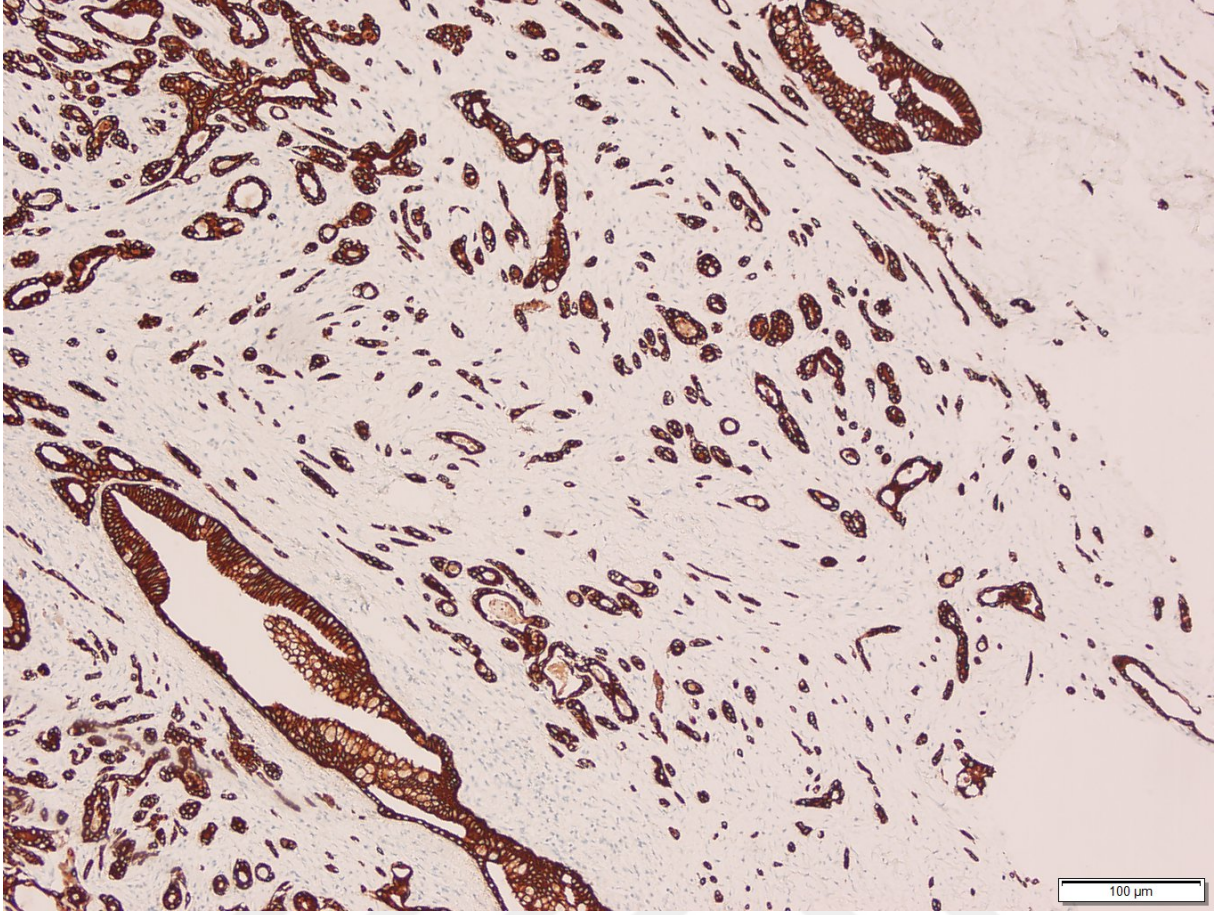
Intratümöral ve peritümöral tümör tomurcuklanmasının EMT ile ilişkili olduğu, literatürde bildirilmektedir. Tümör tomurcuklanmasının morfolojik değerlendirmesi Uluslararası Tümör Tomurcuklanması Konsensus Konferansı (ITBCC) önerilerine uygun şekilde yapılmıştır⁷⁸. TT, ana tümör kitlesinden ayrılan 4 veya daha az tümör hücresinden oluşan infiltratif tümör hücre grupları olarak tanımlanmıştır. Tümörün infiltratif sınırındaki hücre/hücre grupları “Peritümöral tomurcuklanma (PTT)”, tümör içerisindeki tomurcuklar ise “İnatümöral tomurcuklanma (İTT)” olarak isimlendirilmiştir. TT, HE kesitlerde (Resim 1-2) ve Sitokeratin (pan-CK) immünohistokimyasal boyası (Resim 3) ile değerlendirilmiştir. HE ve pan-CK ile boyalı kesitler, 4X'lük objektif ile taranarak hem tümörün infiltratif ucunda hem de santralinde TT'sinin en yoğun olduğu alanlar belirlenmiştir. Daha sonra seçilen büyük büyütme alanında (40X) PTT ve İTT alanlarında tümör tomurcukları sayılmıştır. 0-4 arası TT izlenen olgular düşük derece (TT1), 5-9 arası TT izlenen olgular orta derece (TT2), 10 ve üzeri TT izlenen olgular ise yüksek (TT3) dereceli TT olarak sınıflandırılmıştır.



Resim 1: Tümör çevresi tomurcuklanma, H&E x10



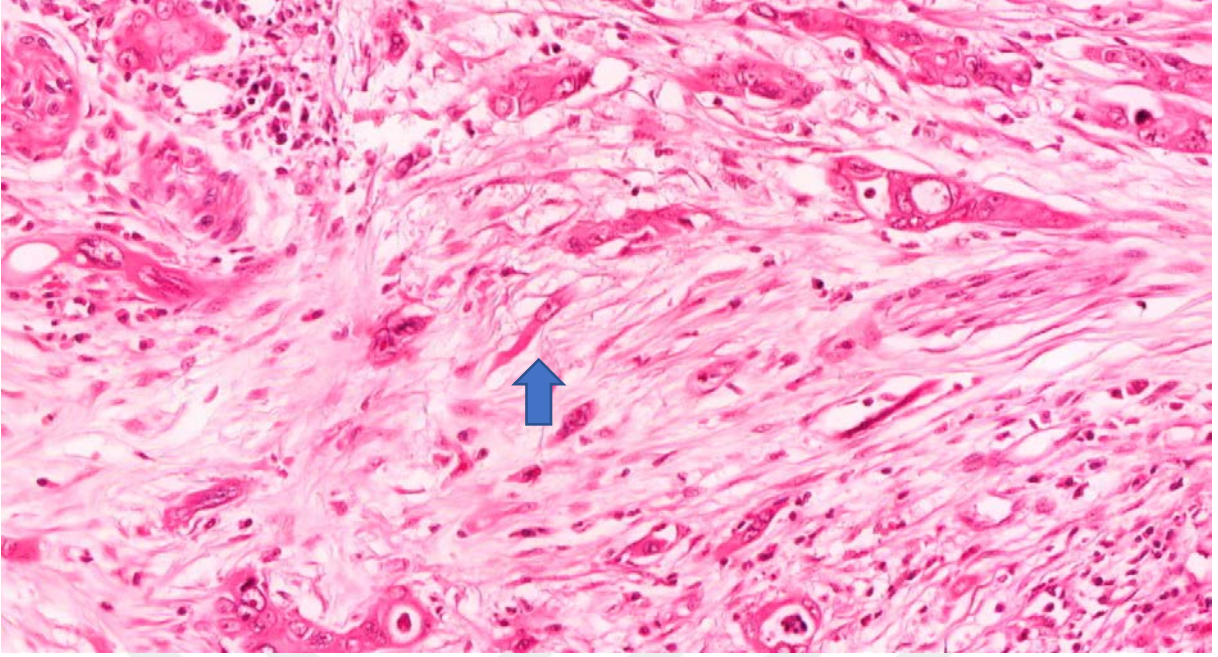
Resim 2: Tümör içi tomurcuklanma, H&E x10



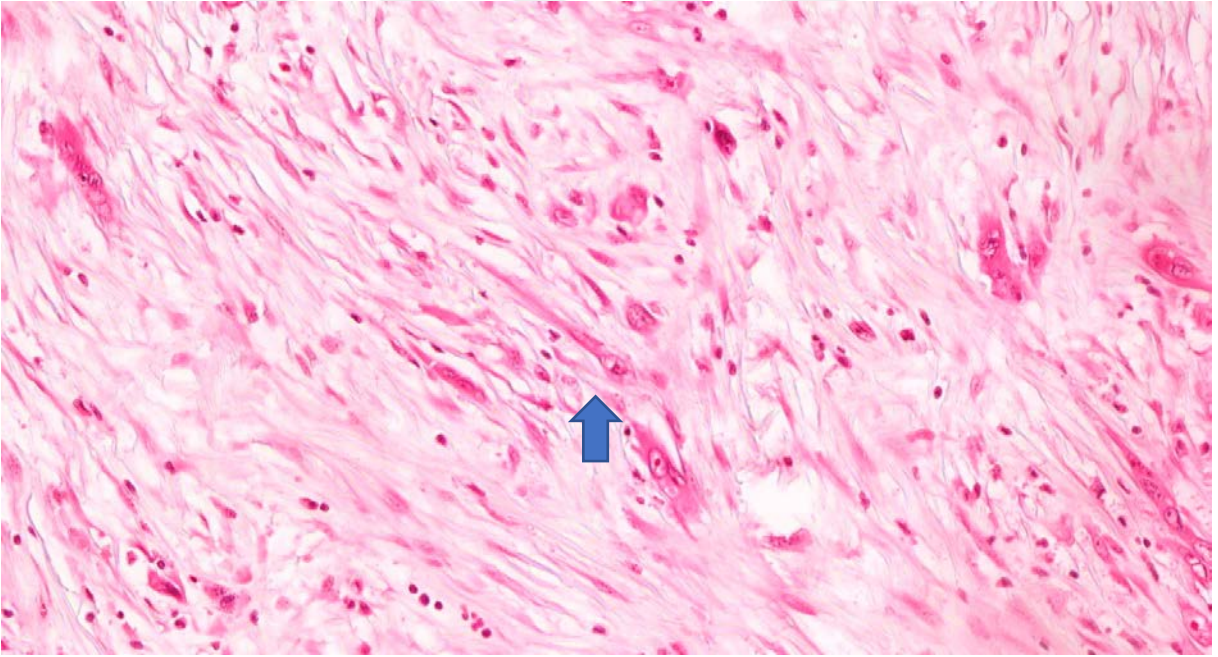
Resim 3: Keratin ile pozitif tümör tomurcuklanması, İHK x10

3.2.2 Mezenkimal Fenotip (MP)- Ön-arka polarite değişimi (Front-back polarity)

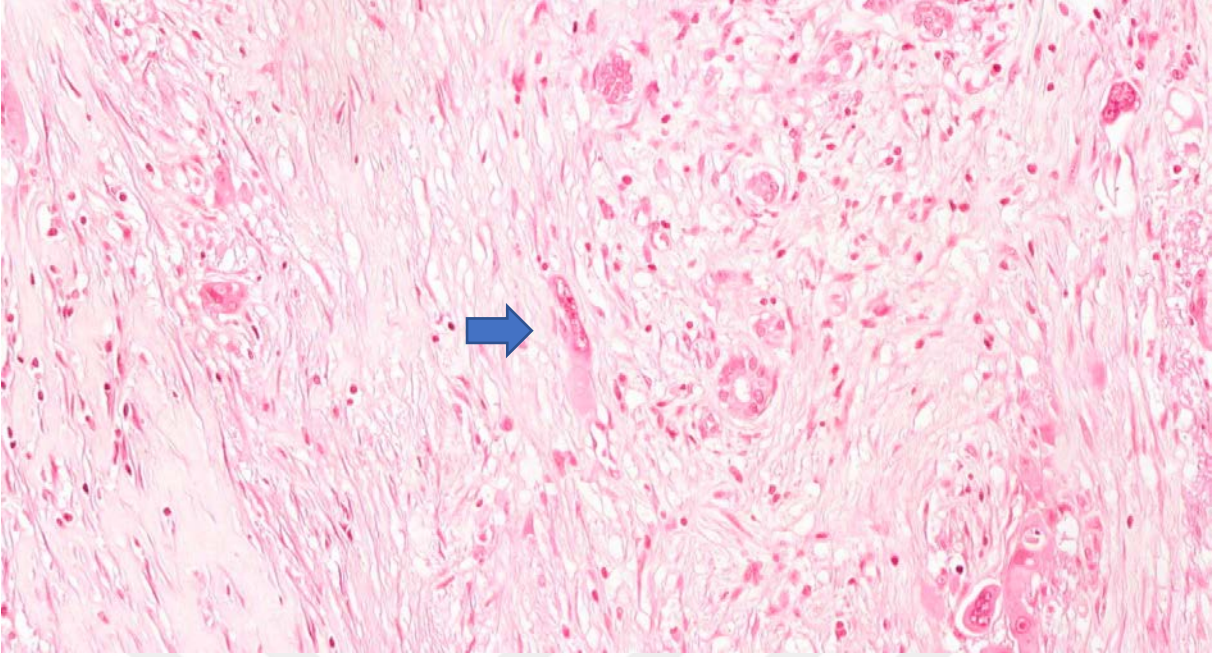
Subsellüler bir değişiklik olarak tanımlanan, ön-arka polarite değişimi (front-back polarity) de EMT ile ilişkili olarak bildirilmekte ancak bu bulgunun morfolojik yansıması olan tümör hücrelerinin içsi ve elonge görünümü, literatürde pankreas tümörlerindeki prognostik değeri açısından incelenmemiştir⁶². Tümör tomurcuklanmasının bulunduğu alanlarda, içsi elonge morfolojide hücrelerinin varlığı, mezenkimal fenotip (front-back polarity) bulgusu olarak HE düzeyinde var ya da yok olarak değerlendirilmiştir (Resim 4- 7). Ayrıca bu hücrelerin immünohistokimyasal olarak Vimentin ekspresyonu da incelenmiştir.



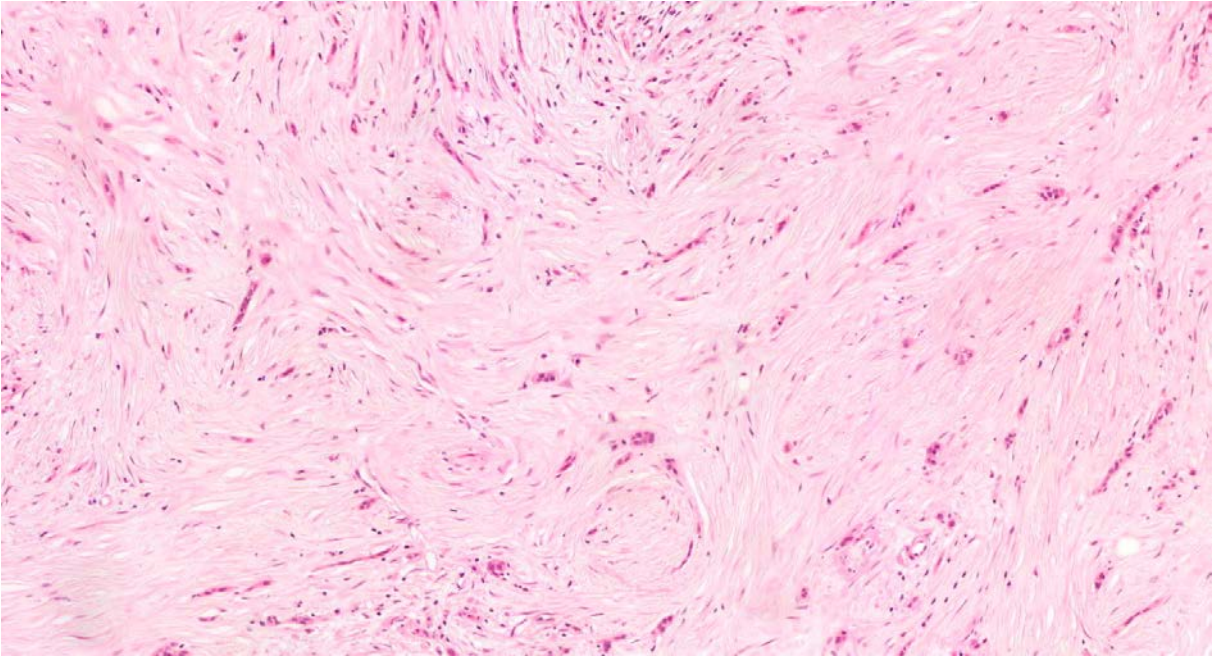
Resim 4: İğsi, elongate morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, MF H&E x20



Resim 5: İğsi, elongate morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, H&E x20



Resim 6: İğsi, elongate morfolojide tomurcuklanan tümör hücreleri, H&E x20

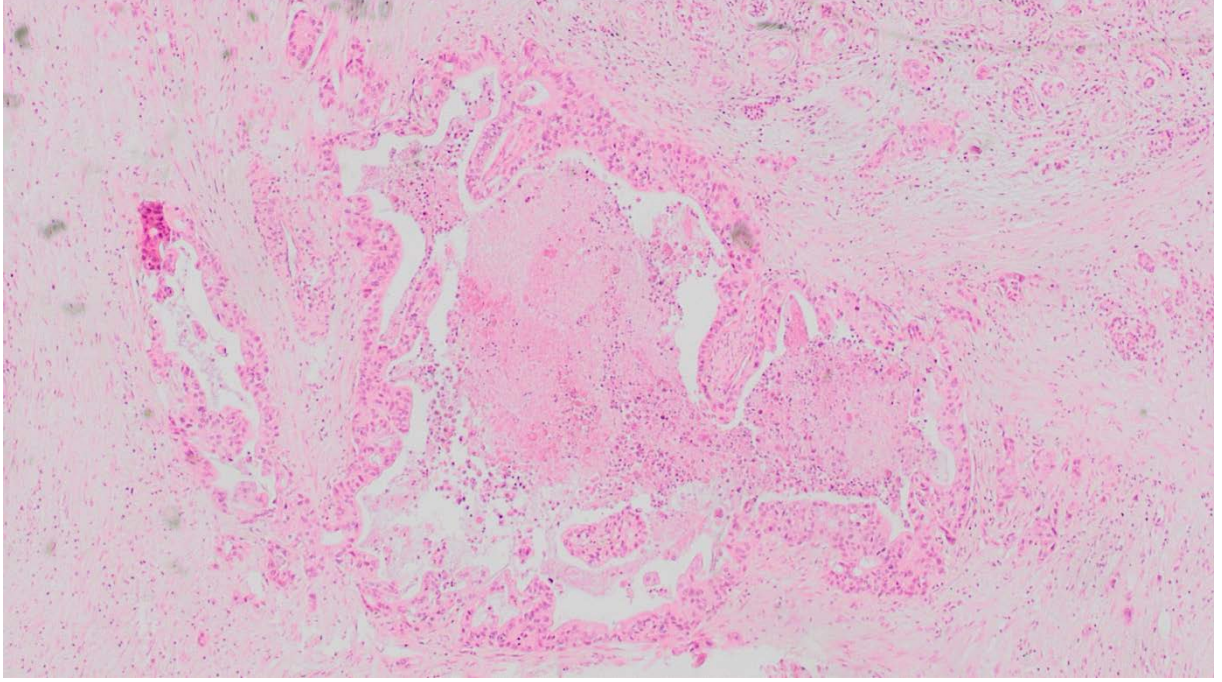


Resim 7: İğsi morfolojiye sahip diskoheziv malign epitelyal hücreler, H&E x10

3.2.3 Apikal-Bazal Hücre Polarite Kaybı (ABHPK)

Epitelyal hücre formu ve işlevi için önem taşıyan apikal-bazal polaritenin kaybı da literatürde epitelden mezenkimale geçişte, epitelyal adezyonlarda kayıp nedeniyle⁶⁵

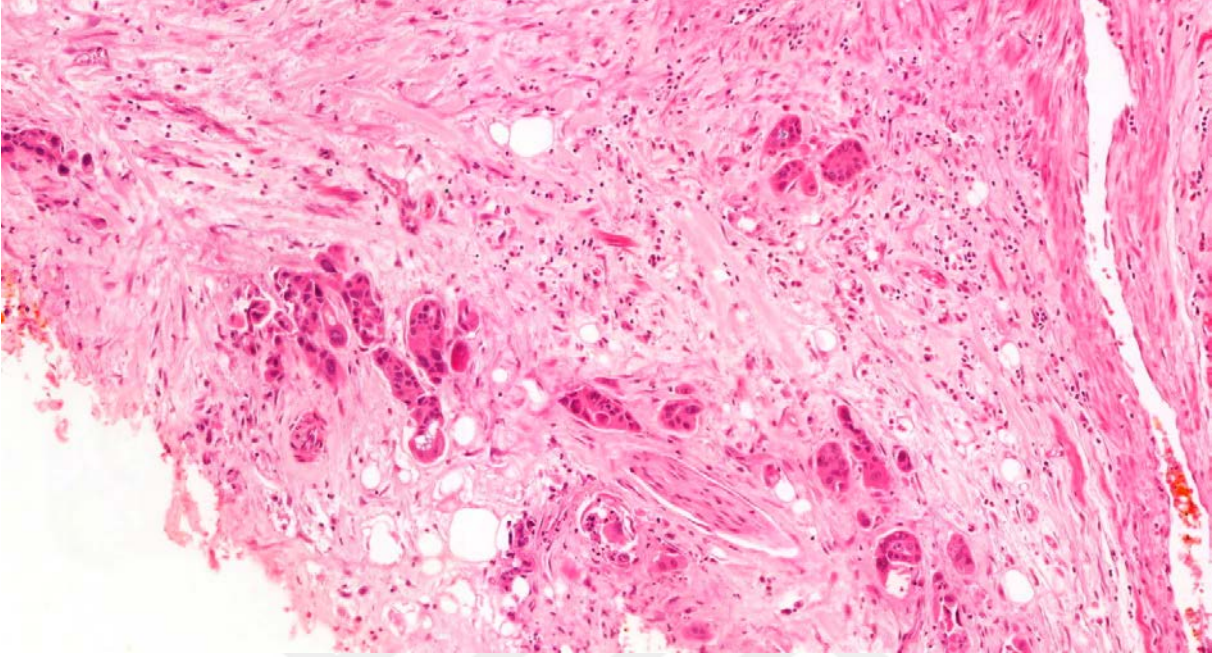
oluşan ve ön arka polarite değişimi ile aynı spektrumda bulunan bir değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Apikal bazal hücre polarite kaybı malign bezlerdeki epitel hücrelerinde düzensiz ve şekilsiz sıralanma; yani polaritenin bozulması olarak var ya da yok olarak değerlendirilmiştir (Resim 8).



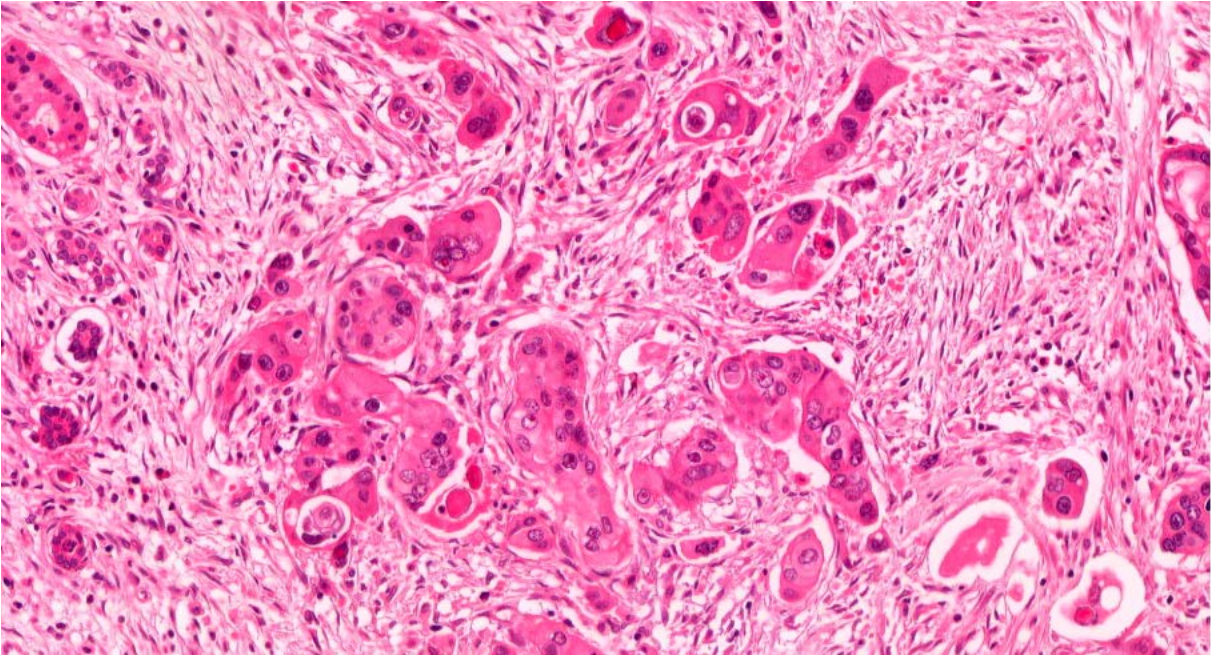
Resim 8: Malign epitelyal hücrelerin düzensiz ve şekilsiz sıralanması, H&E x20

3.2.4 Tomurcuktan büyük hücre grupları (TBHG)

EMT'de epitelyelden mezenkimale geçişte çok farklı fenotiplerde tümör hücrelerinin görülebileceği bilinmektedir⁶⁵. Tümör tomurcuklanmasında maksimum 4 hücreden oluşan gruplar dikkate alınmaktadır. Daha büyük, gland oluşturmeyen hücre toplulukları ise literatürde ilk kez serimizde değerlendirilen bir morfolojik bulgudur. Beş ve üzeri hücreden oluşmuş, lümen yapısı oluşturmeyen, ancak TT olarak tanımlanamayacak tümör hücresi toplulukları, tomurcuklanmadan büyük hücre grupları (TBHG) olarak tanımlanmıştır (Resim 9-10). TBHG, bez epitelinde EMT'nin başladığı hücrelerin adezyon yeteneklerini kaybetmesi sonucu, bezden ayrılmış belki de tomurcuklanmaya geçişte ara form olabilecek hücre grupları olarak nitelendirilebilir. Bu tümör hücresi topluluklarının varlığı tümörlerde değerlendirilmiştir.



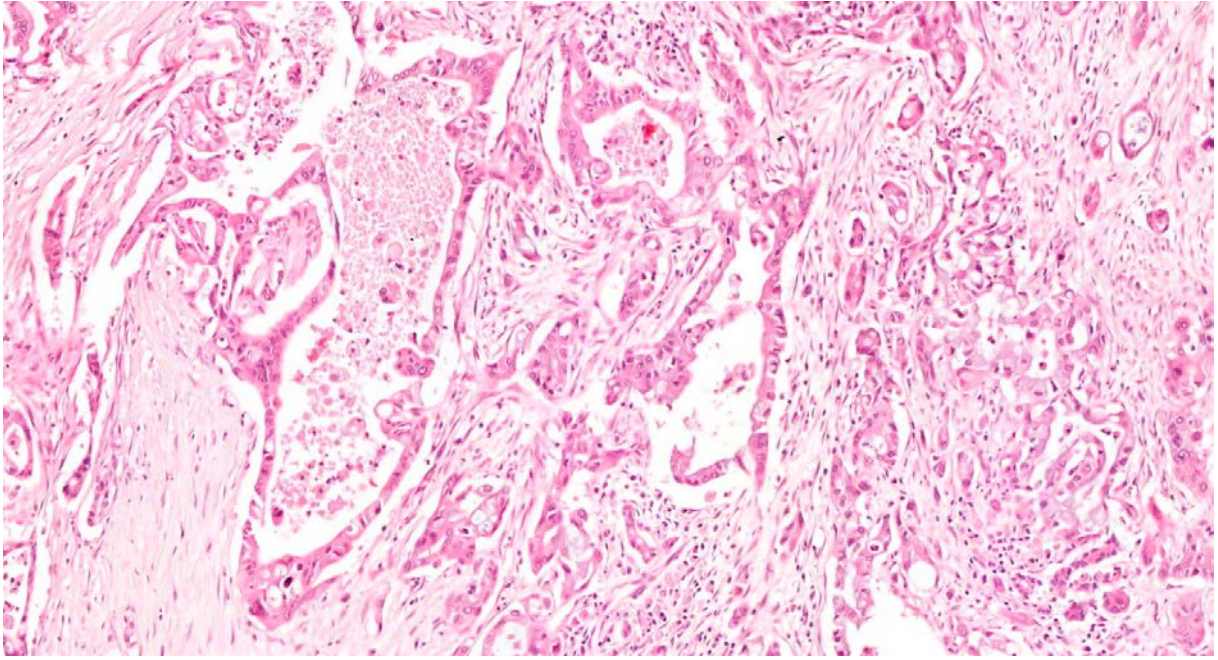
Resim 9: Tomurcuklanmadan büyük hücre grupları, H&E x10



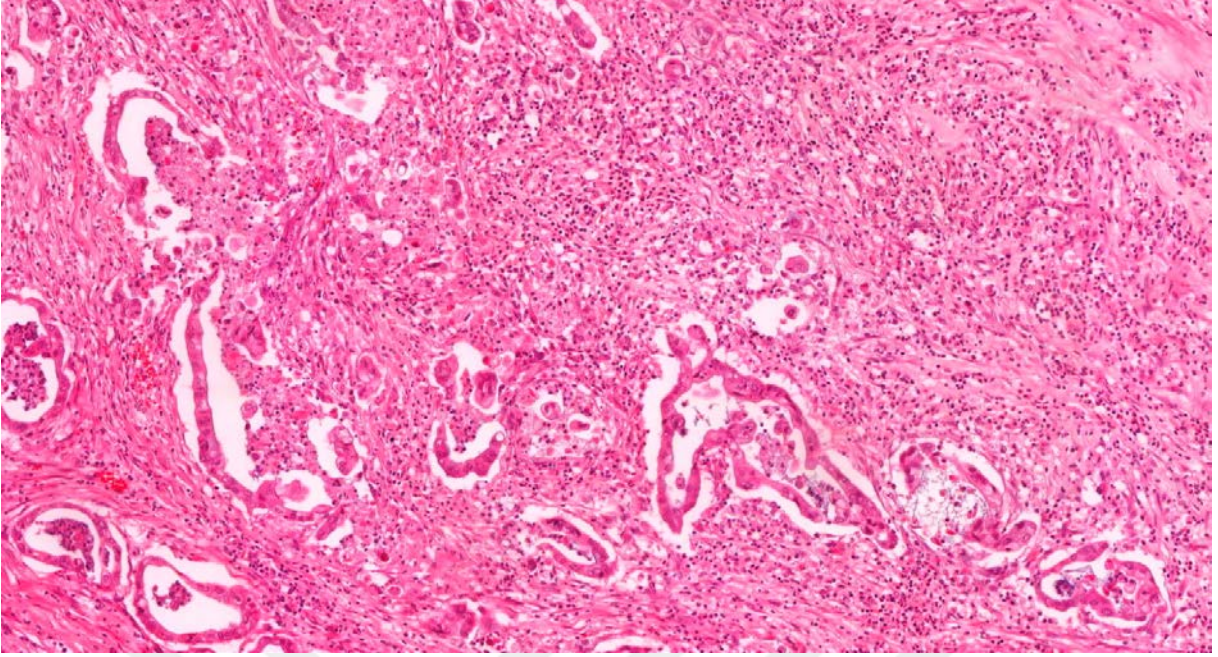
Resim 10: Tomurcuklanmadan büyük hücre grupları, H&E x20

3.2.5 İnkomplet glandlar

Tümör kesitleri, kesit ya da takip artefaktı nedenli olmayan, lümen bütünlüğü bozulmuş, yarım olarak izlenen, inflamasyon da içerebilen malign glandların varlığı açısından değerlendirilmiştir (Resim 11-12).



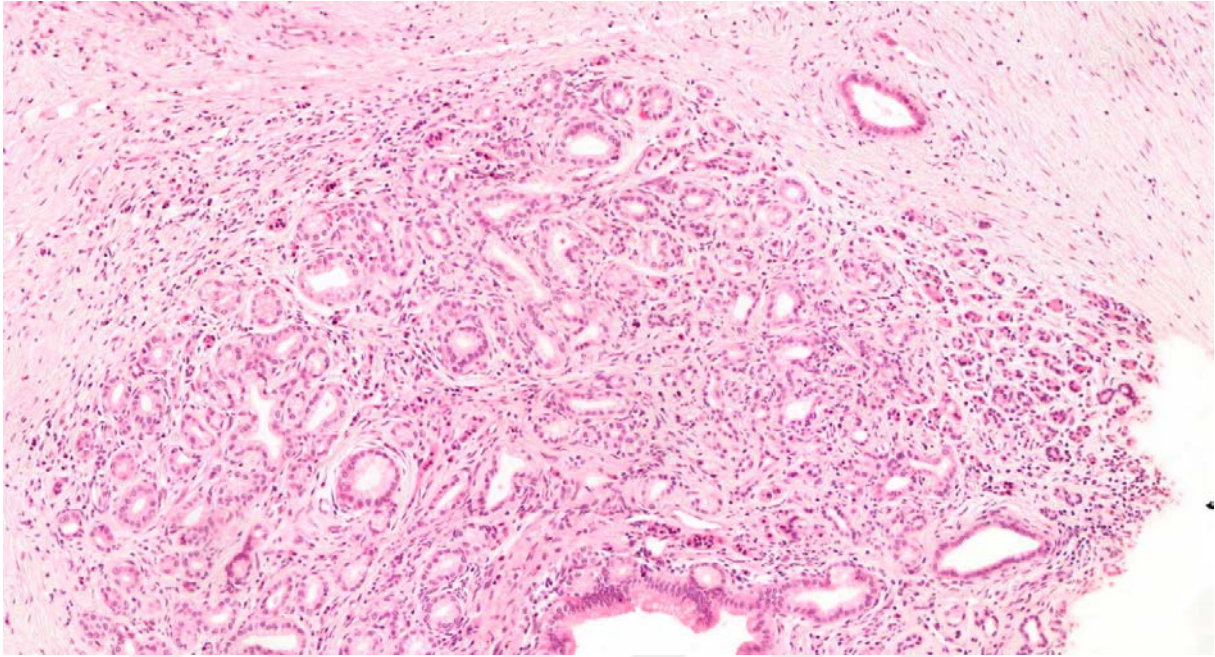
Resim 11: İnkomplet glandlar, H&E, x10



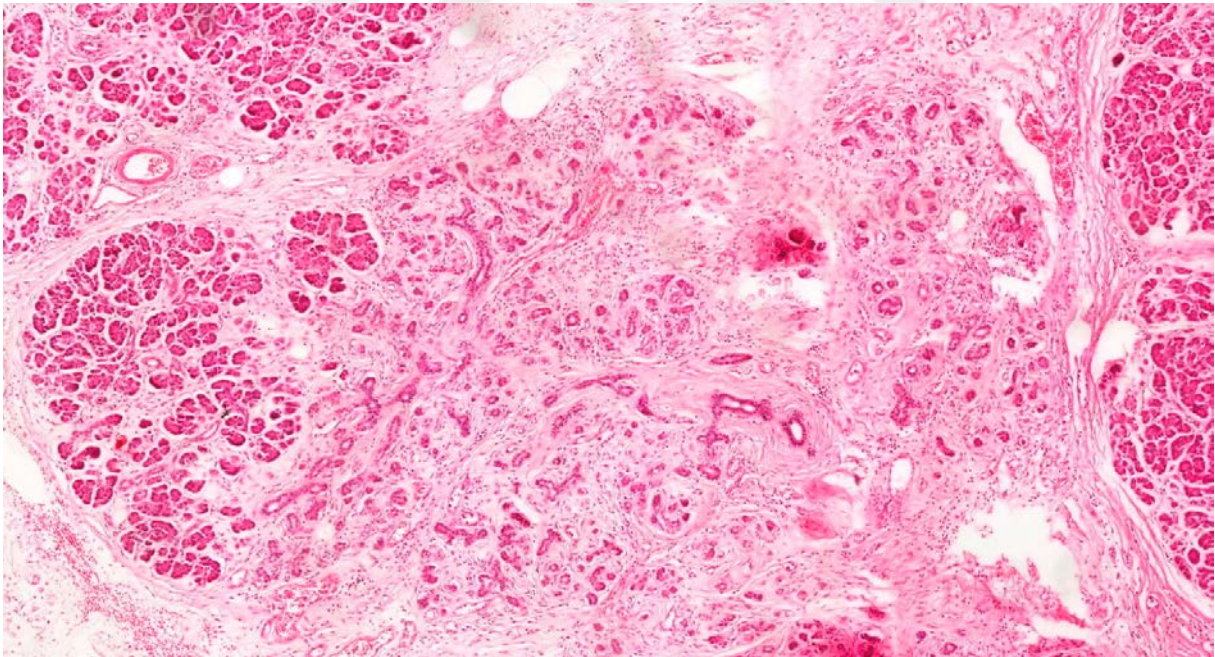
Resim 12: İnkomplet glandlar, H&E, x10

3.2.6 Asiner duktal metaplazi (ADM)

PDAK'ın prekürsör lezyonlarında, EMT'in etkinleşmesi, inflamatuvar ortamın etkisiyle başlar. ADM'de inflamatuvar mikroçevre tarafından tetiklenen EMT aktivasyonunun, kanser hücrelerinin erken invazyon ve yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir⁶⁷. Tümör kesitlerinde, korunmuş çevre parankim içerisinde, pankreas asiner hücrelerinin duktal benzeri hücrelere farklılaştığı metaplastik değişikliklerin varlığı değerlendirilmiştir (Resim 13-14).



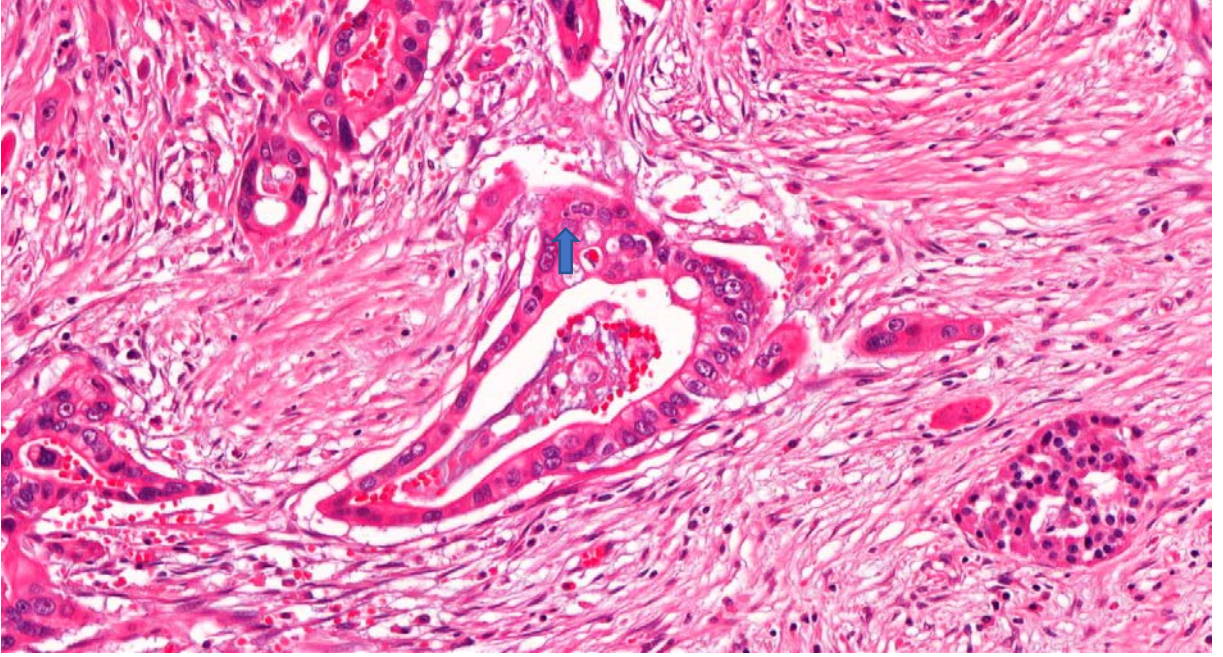
Resim 13: Asiner duktal metaplazi, H&E x10



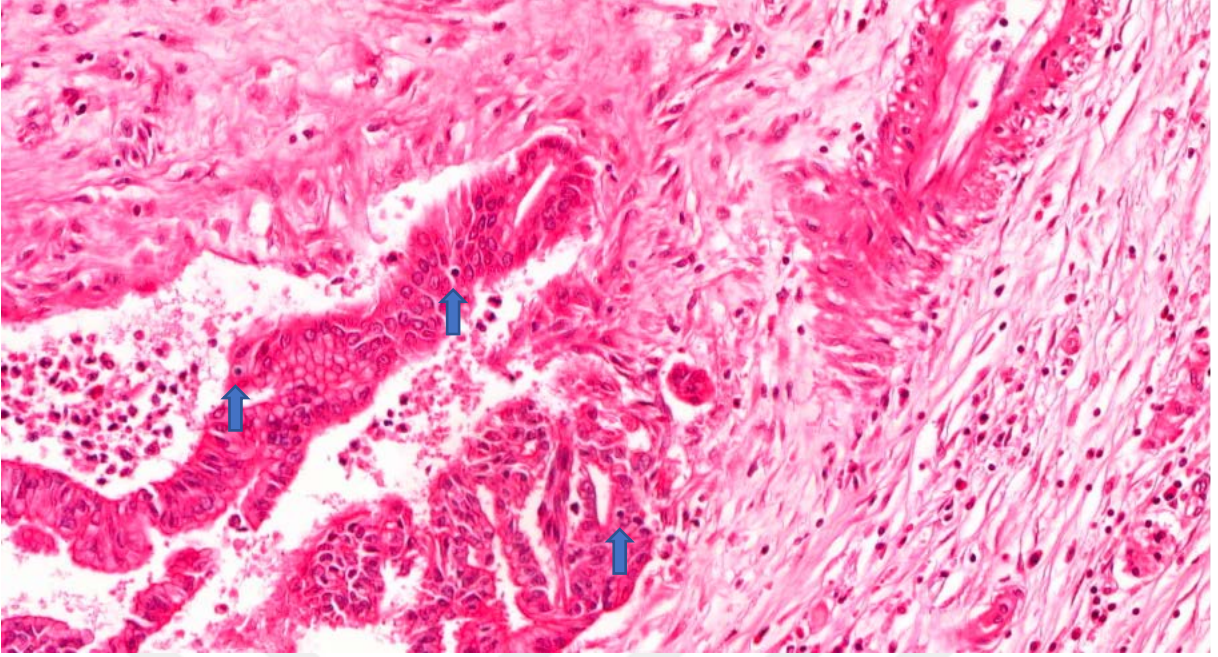
Resim 14: Asiner duktal metaplazi, H&E x5

3.2.7 Tümör içi ve çevresi lenfosittik infiltrat (TİLİ, TÇLİ)

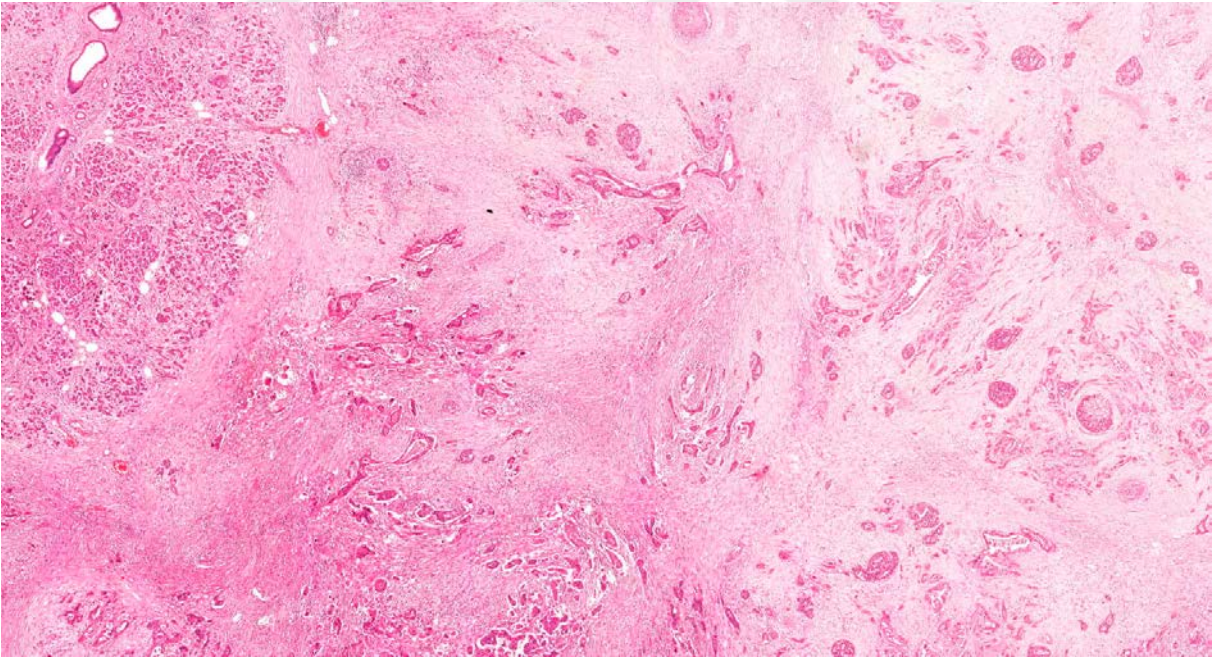
Tümör içi ve tümör çevresi lenfositik yanıt College of American Pathologists (CAP) tarafından yayınlanan kanser raporlama protokolüne göre belirlenmiştir. Tümör epitelini infiltre eden lenfosit miktarı dikkate alınarak; Lenfosit yok (0), 1 BBA'da epitelini infiltre eden 1 veya 2 lenfosit hafif-orta (1), 3 ve fazla lenfosit yüksek (2) infiltratif yanıt olarak değerlendirilmiştir (Resim 15-18).



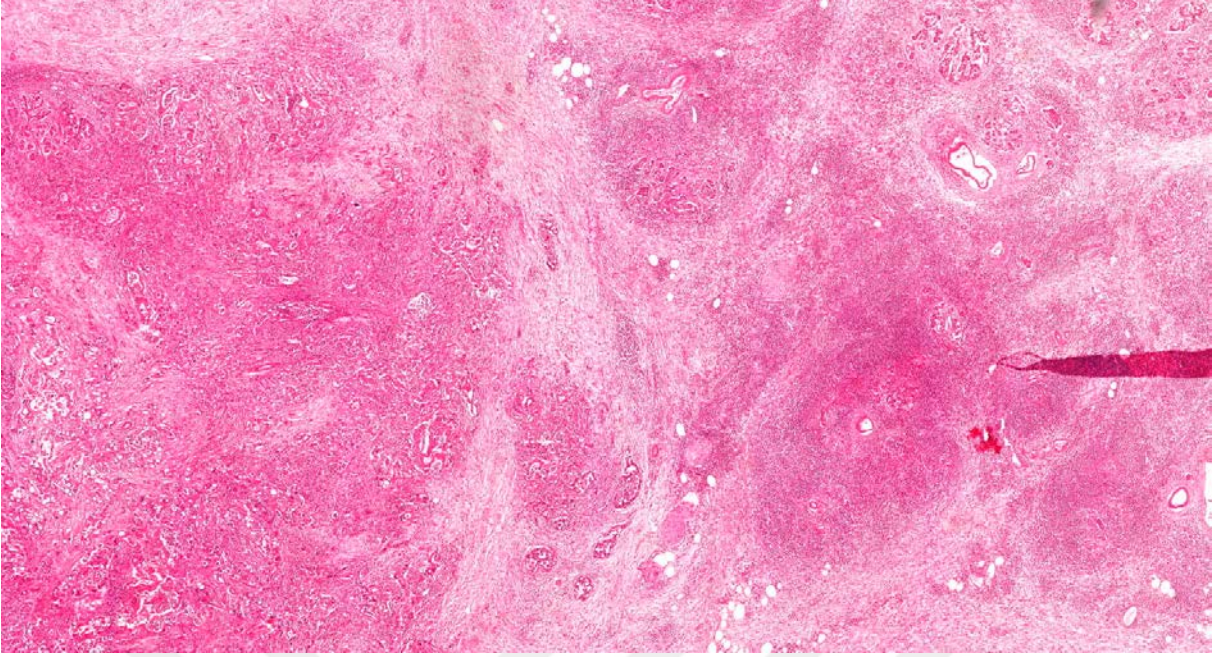
Resim 15: Tümör içi lenfosittik yanıt, 1 BBA'da epitelini infiltre eden 1 veya 2 lenfosit, hafif orta infiltratif yanıt (1), H&E x20



Resim 16: Tümör içi lenfositik yanıt, 1 BBA'da epiteli infiltre eden 3 veya daha fazla lenfosit, yüksek infiltratif yanıt (2), H&E x20



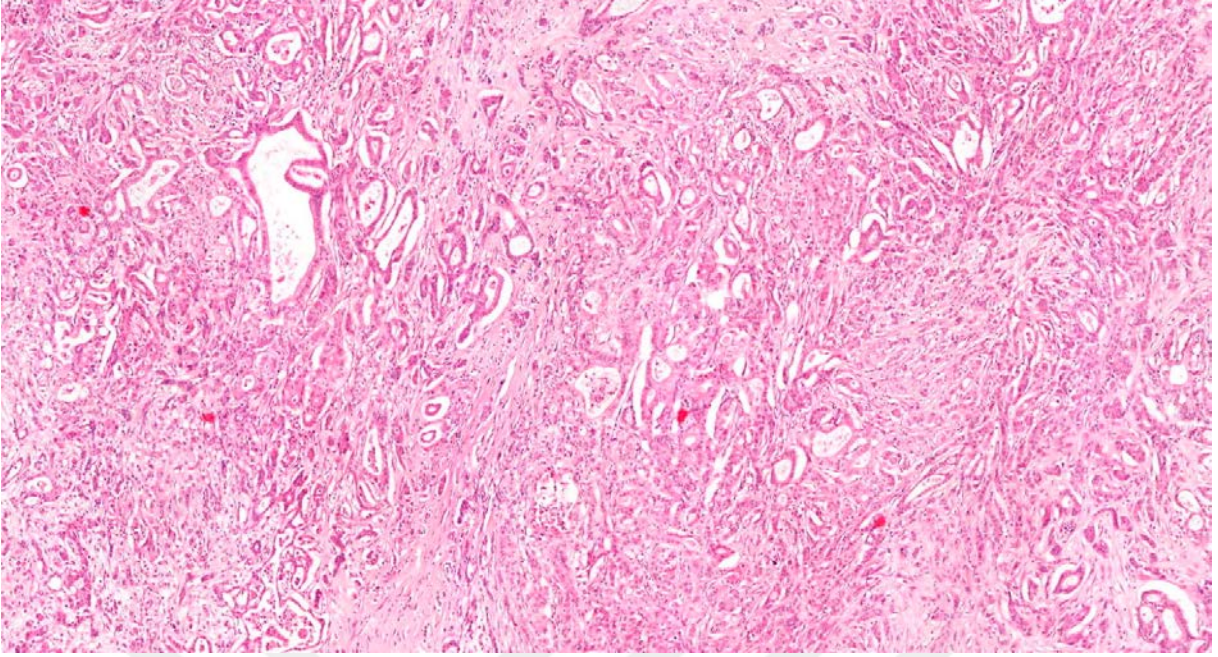
Resim 17: Tümör çevresi düşük infiltratif yanıt (1), H&E x2



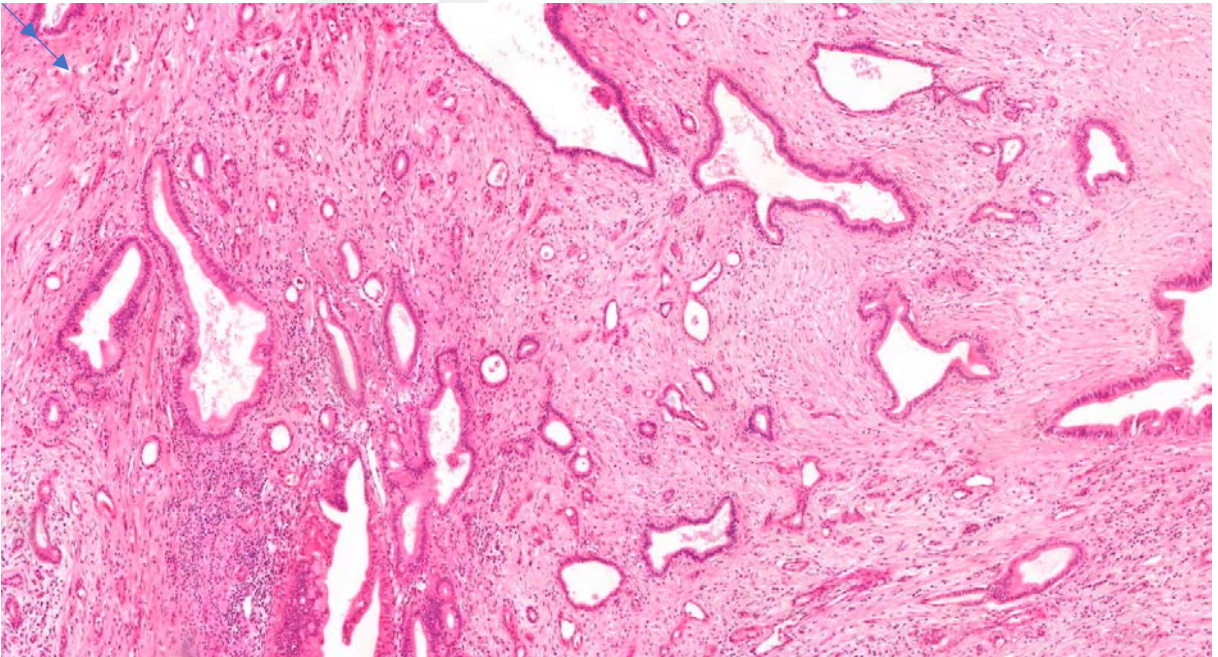
Resim 18: Tümör çevresi yüksek infiltratif yanıt (2), H&E x2

3.2.8 Stroma miktarı

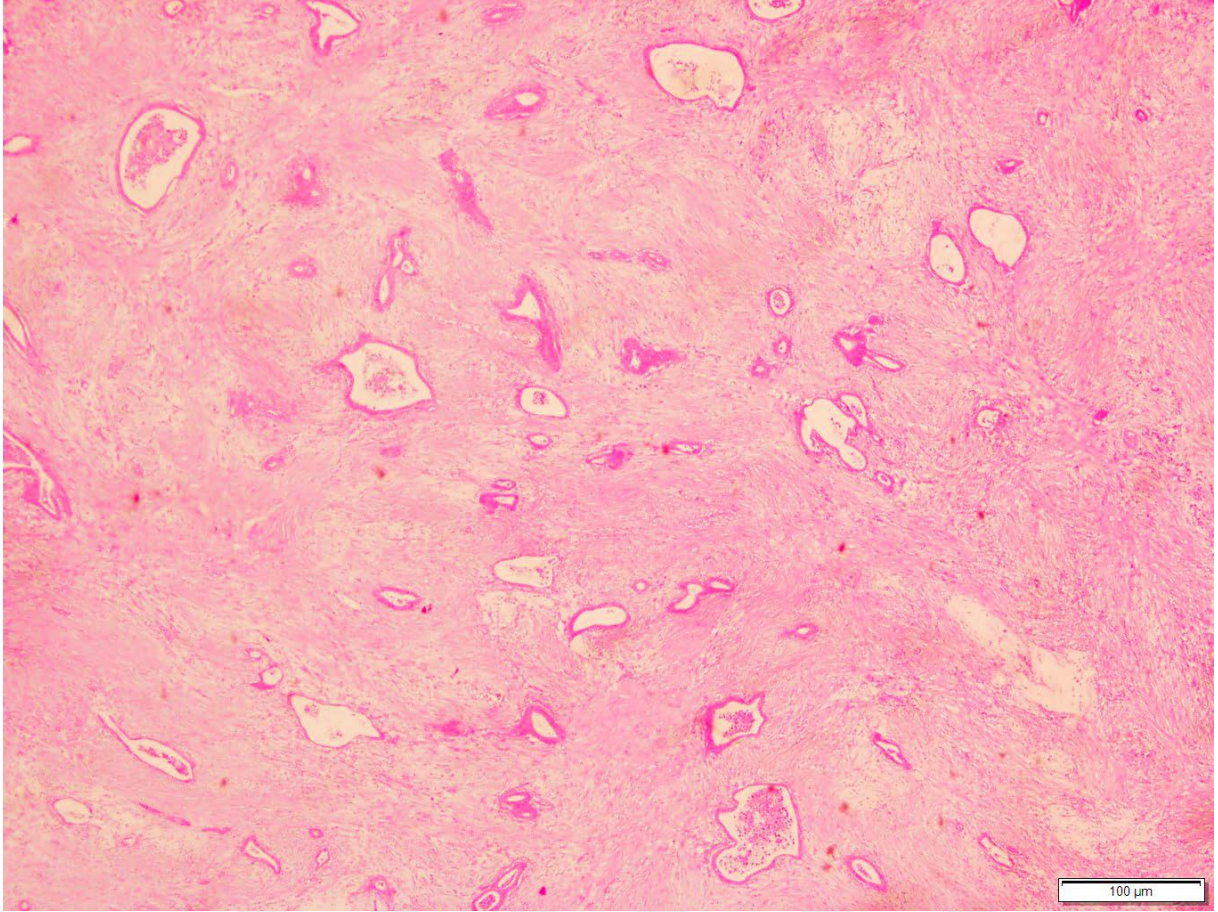
Tümöre ait kesitlerde malign bezler ile tümör içi stromanın oranı göz önüne alınarak, stroma/bez oranı ≤ 1 olan tümörler az miktarda stroma (1), 1 ile 2 arası olanlar orta miktarda stroma (2), stroma/bez oranı ≥ 2 olan tümörler ise belirgin stroma (3) olarak değerlendirilmiştir (Resim 19-21).



Resim 19: Az miktarda stroma (1), H&E x10



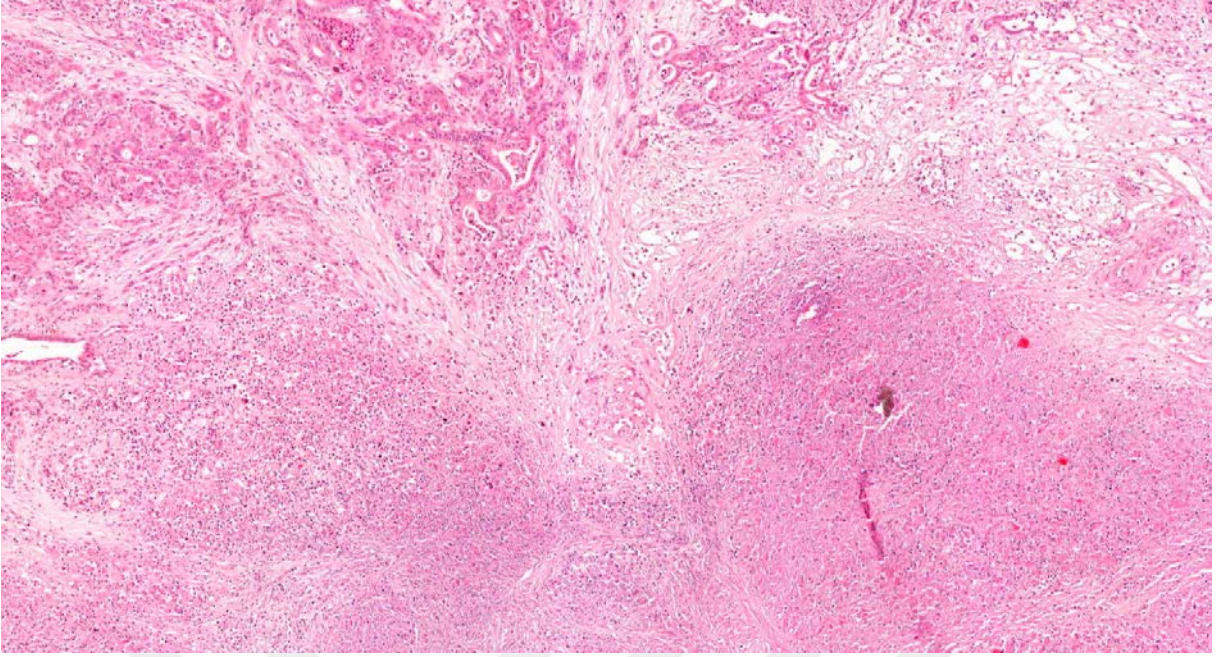
Resim 20: Orta miktarda stroma (2), H&E x10



Resim 21: Belirgin miktarda stroma (3), H&E x10

3.2.9 Nekroz

Tümöre ait kesitlerde, bezlerin lümenlerindeki nekroz alanları değerlendirme dışı tutulmuş, tümör içi stromal alanlardaki yaygın nekroz varlığı dikkate alınmıştır (Resim 22).



Resim 22: Tümör içerisinde yaygın nekroz alanları, H&E x5

3.3 İmmünohistokimyasal Boyama

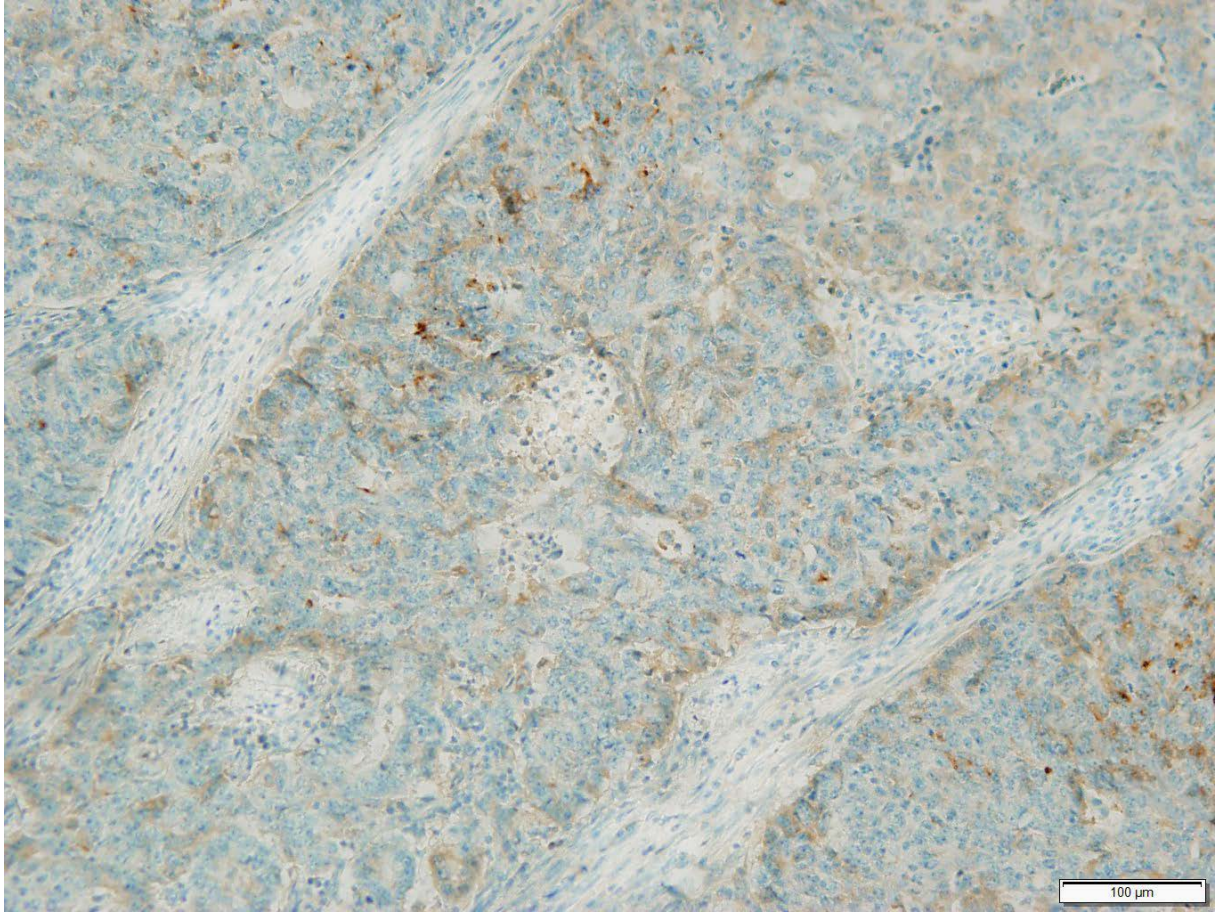
100 olguya ait seçilen bloklardan hazırlanan kesitlere Keratin (DAKO, AE1/AE3, Mouse Anti-human mAb), Vimentin (DAKO, V9, Mouse mAb), E-Cadherin (DAKO, NCH-38, Mouse Anti-human mAb) ve LOXL2 (Cell Signalling, (E3P7Y) rabbit mAb) primer antikorları kullanılarak immünohistokimyasal boyama uygulanmıştır. Çalışmanın immünohistokimyasal inceleme için gereken bütçesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Fonu'ndan karşılanmıştır.

İmmünohistokimyasal yöntem aşağıdaki basamakları içermektedir:

1. Sakura® Accu-Cut SRM marka mikrotom ile lizinli lamlara alınan 3 mikron kalınlığında kesitler, 72 derecede etüvde 60 dk bekletildikten sonra, Ventana Benchmark Ultra cihazına yüklenmiştir.
2. Cihazda lamlara 64 dakika CC1 solüsyonu ile antijen açığa çıkarımı uygulanmış, daha sonra primer antikor damlatıldıktan sonra, 44 dakika, 37 °C'de bekletilmiştir.
3. Boyama streptavidin-biotin yöntemi ile yapılmış ve kromojen olarak Diaminobenzidin Tetrahidroklorid (DAB) kullanılmıştır.

4. Ardından lamlara Hematoksilen ve bluing reagent ile zemin boyaması uygulanmıştır ve lamalar kapatılmıştır.

Keratin, Vimentin ve E-Cadherin antikorları için, normal pankreas parankimi iç pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. LOXL2 antikoruna için ilgili firma tarafından önerilen endometrioid karsinom örneğindeki epitelyal ve stromal hücre boyanması pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Resim 23). İmmunhistokimyasal boyaların değerlendirmeleri sırasında “iç-kontrol” negatifliği veya yetersizliği tespit edilen olgularda boya tekrarlanmıştır.



Resim 23: LOXL2 kontrol dokusu. Endometrioid karsinomunda sitoplazmik boyanma, İHK x10

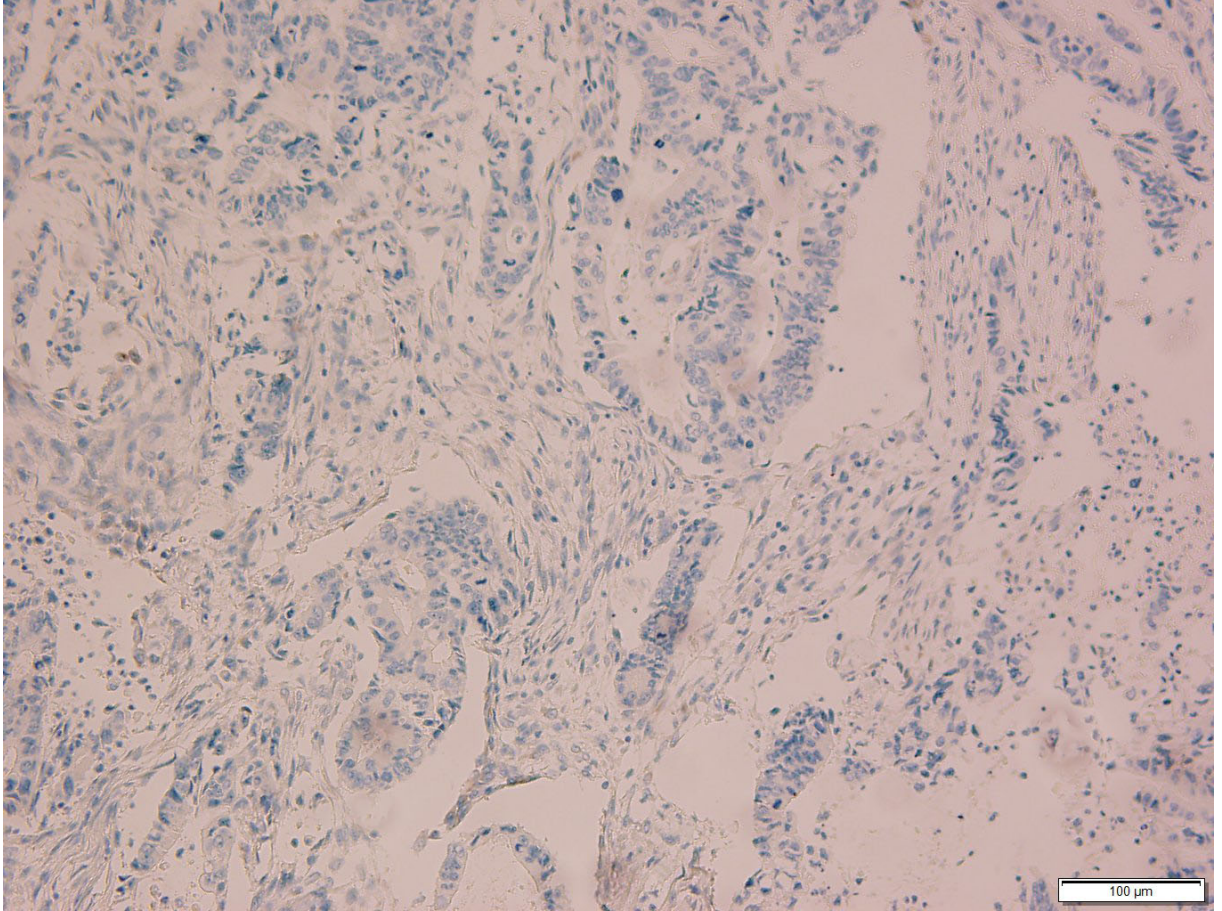
3.3.1 LOXL2 İmmunhistokimyası Değerlendirmesi

Tümör epitelyal hücrelerinde ve stromal hücrelerinde LOXL2 ekspresyonu, Pil-Gu Park ve ark.'ın belirlediği yöntem ile ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Hücrelerde LOXL2 ekspresyon yoğunluğu her olguda (0-1-2 olarak) skorlanmıştır (Tablo 3). LOXL2 boyanması tümör içerisinde fokal alanlarda izlenmiştir bu sebeple

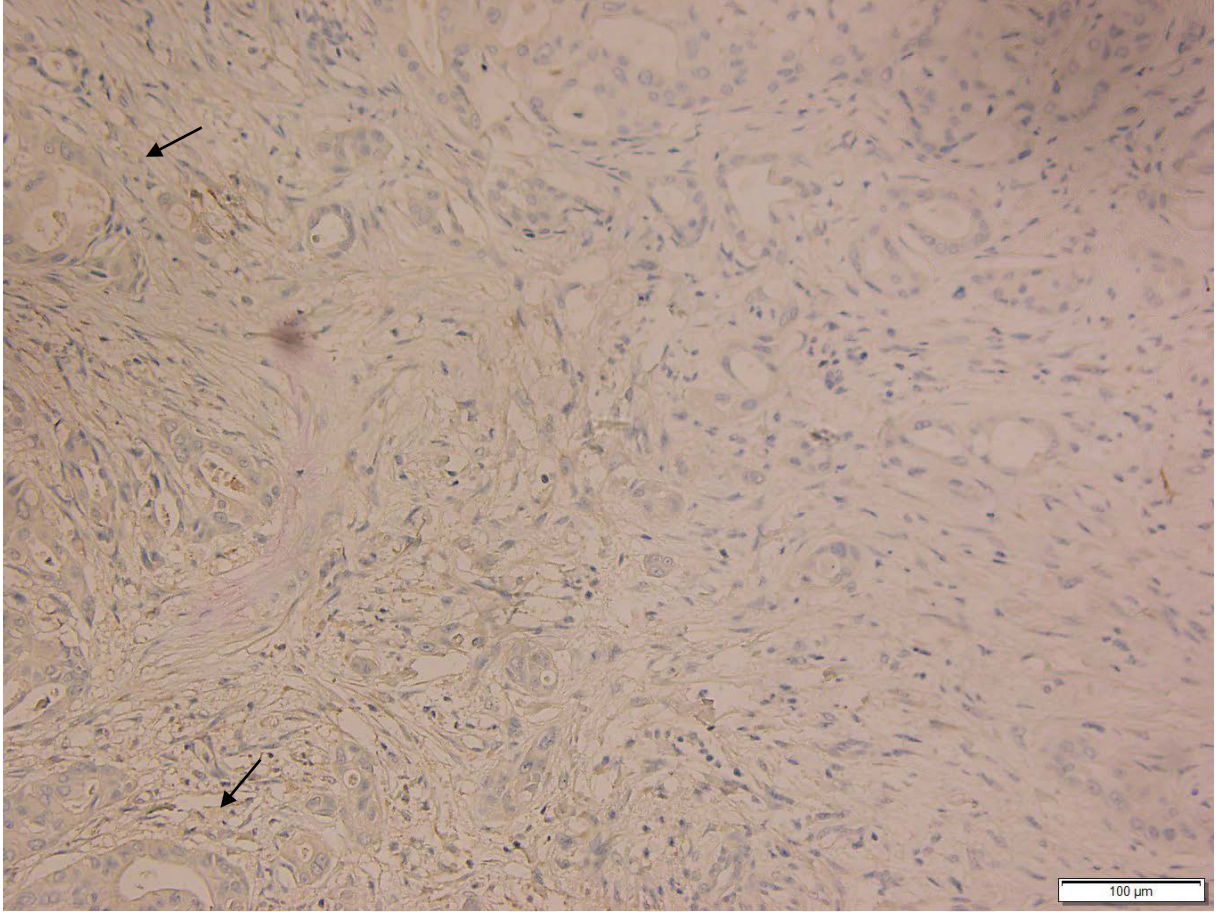
değerlendirme bu fokal alanlardaki boyanma yaygınlığı ve şiddetine göre yapılmıştır (Resim 24-26). Stromadaki boyanmalarda %10'un altı sıfır olarak kabul edilmiş, %10 üzeri boyanmalar 1-2 olarak semikantitatif değerlendirilmiştir (Resim 27).

LOXL2 epitelyal boyanma yoğunluğu	Skor
Boyanma yok.	0
Zayıf Boyanma, sadece BBA'da görünüyor.	1
Zayıf-Orta boyanma KBA'da görünüyor.	2

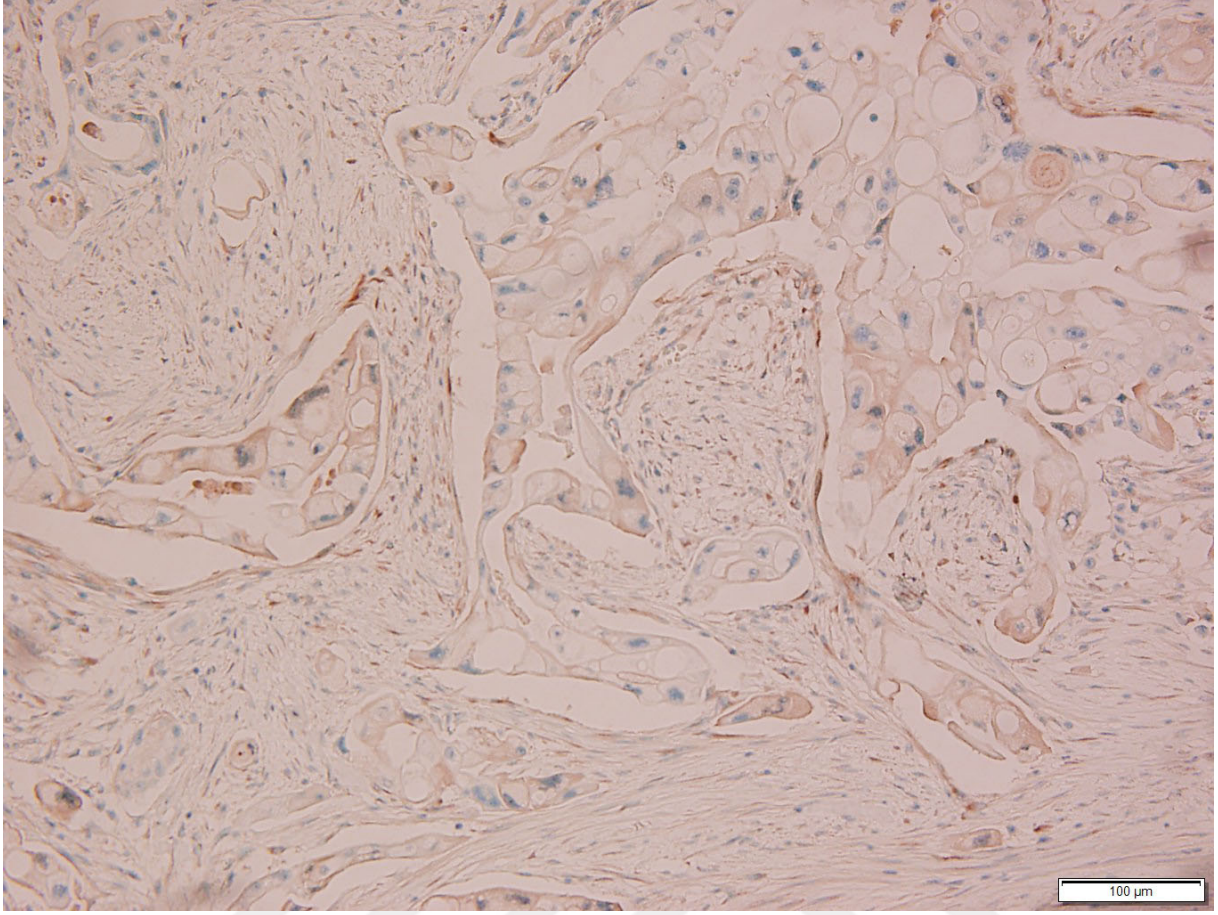
Tablo 3: LOXL2 epitelyal boyanma yoğunluğu skorlaması (*BBA: Büyük büyütme alanı, **KBA: Küçük büyütme alanı)



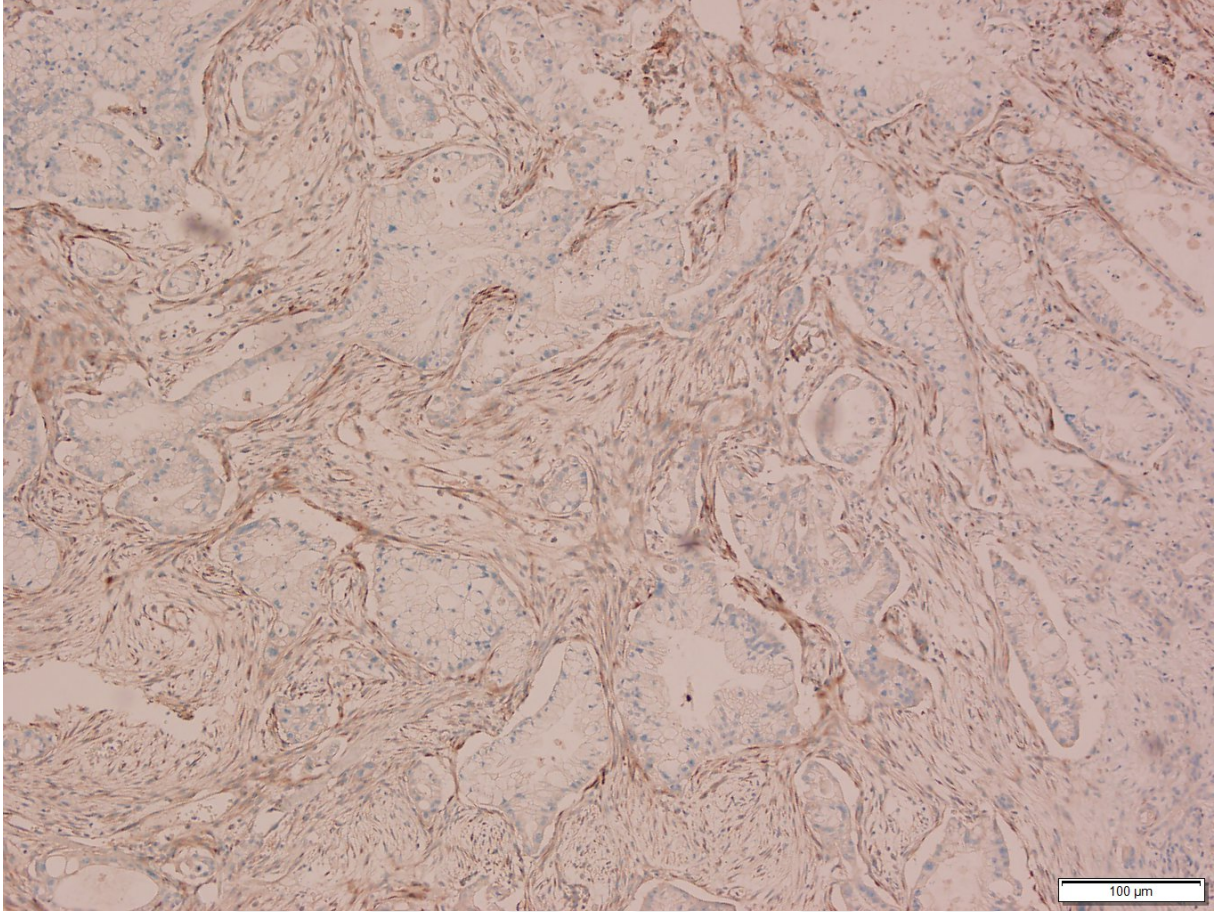
Resim 24: LOXL2 negatif tümör (0), İHK x10



Resim 25: LOXL2 zayıf epitelyal boyanma (1), İHK x10



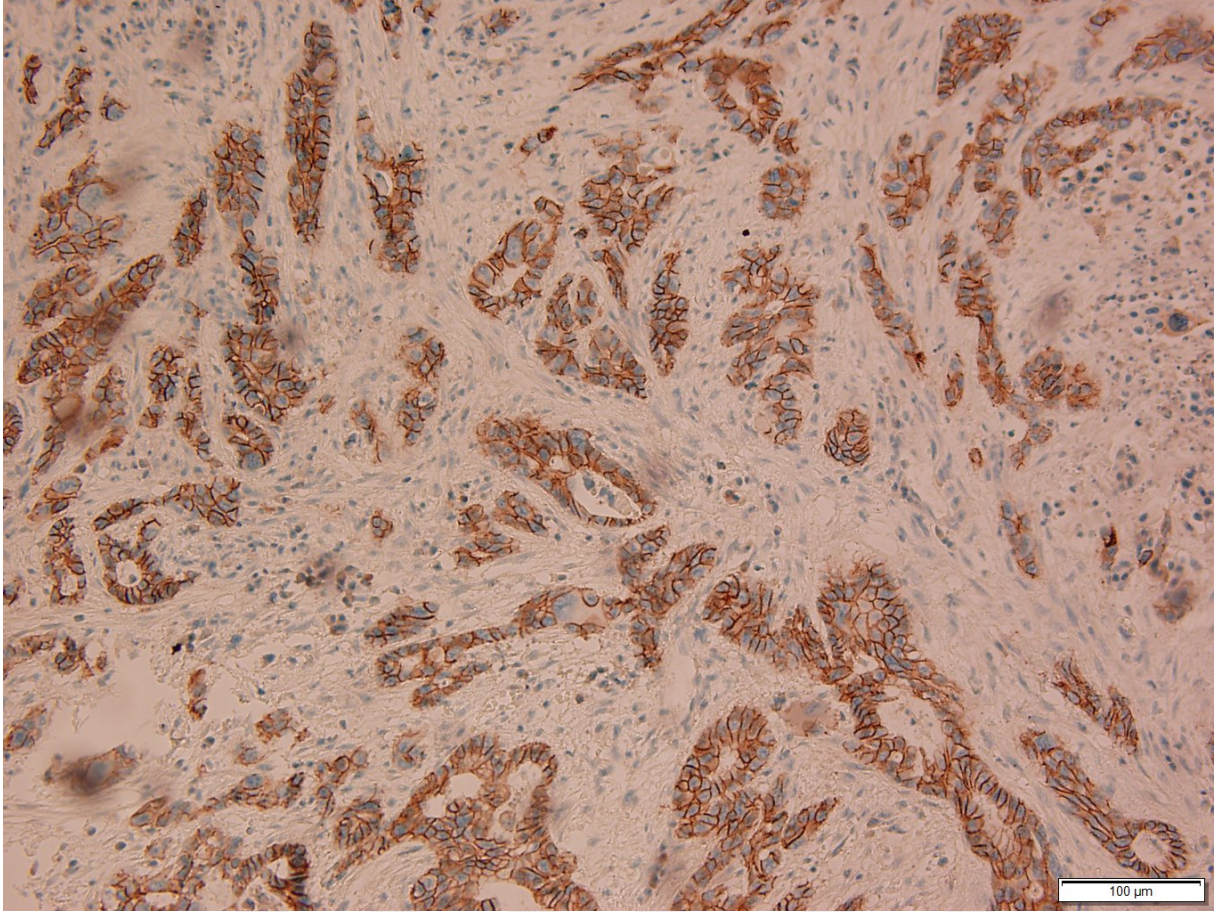
Resim 26: LOXL2 epitelyal zayıf-orta boyanma (2), İHK x10



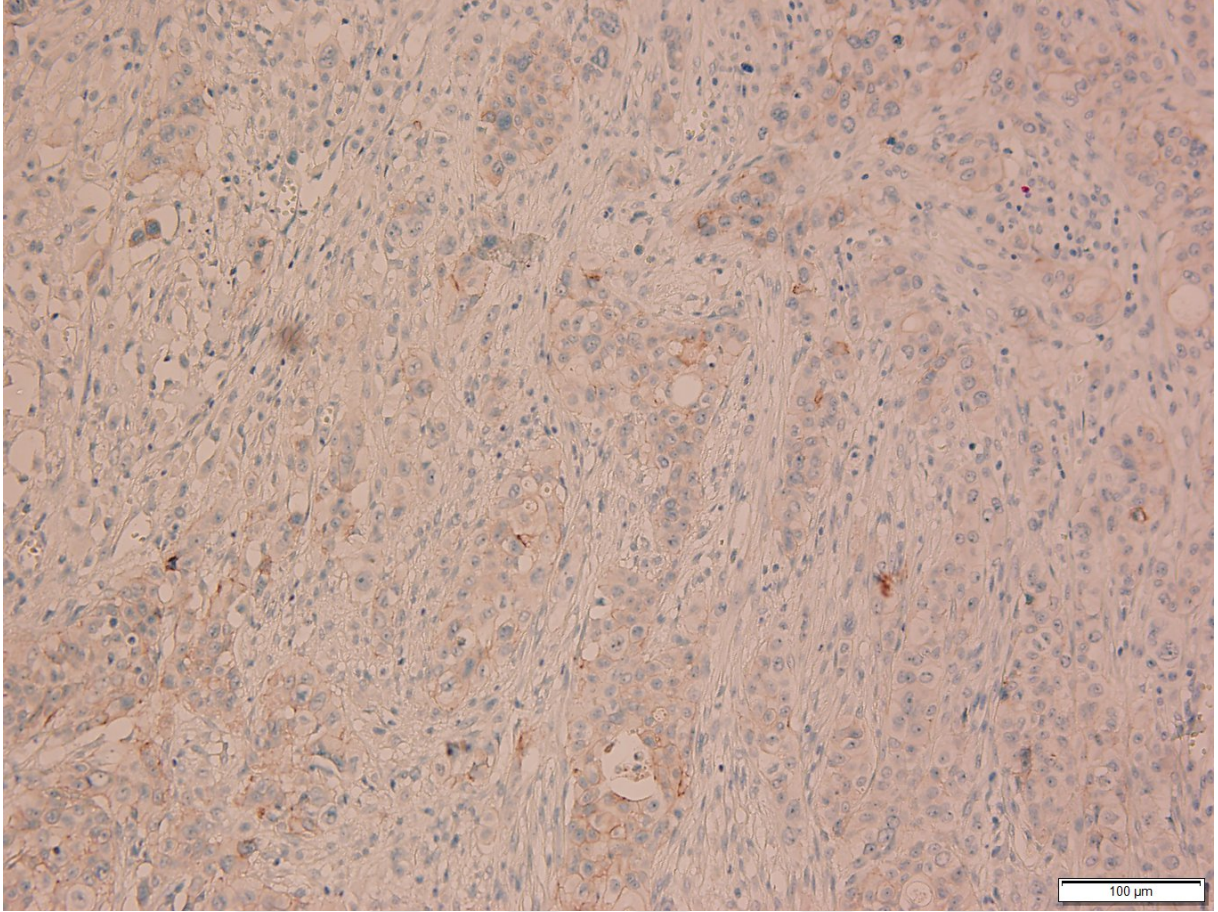
Resim 27: LOXL2 stromal boyanma (2), İHK x10

3.3.2 E-Cadherin İmmunhistokimyası Değerlendirmesi

E-Cadherin ile hücrelerdeki sitoplazmik membran boyanması pozitif kabul edilmiştir. Çevre pankreas dokusu ile aynı şiddetteki ve %90 üzeri yaygınlıktaki boyanmalar pozitif: korunmuş (+2), daha zayıf %10-90 yaygınlıkta boyanmalar: kısmi kayıp (+1), membranöz boyanma izlenmeyen ya da %10'dan az izlenen durumlar da tam kayıp (0) olarak skorlanmıştır (Resim 28-29).



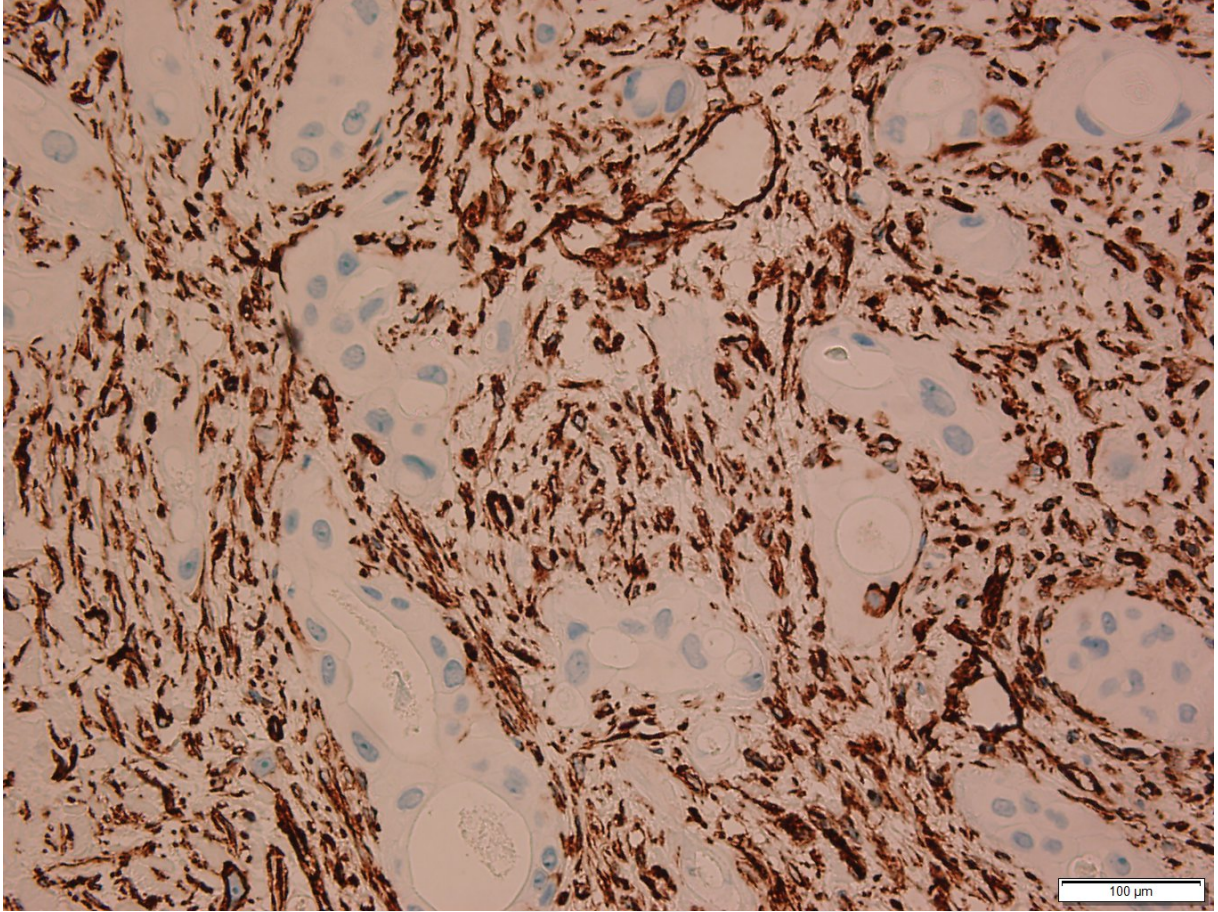
Resim 28: E-Cadherin pozitifliği, İHK x10



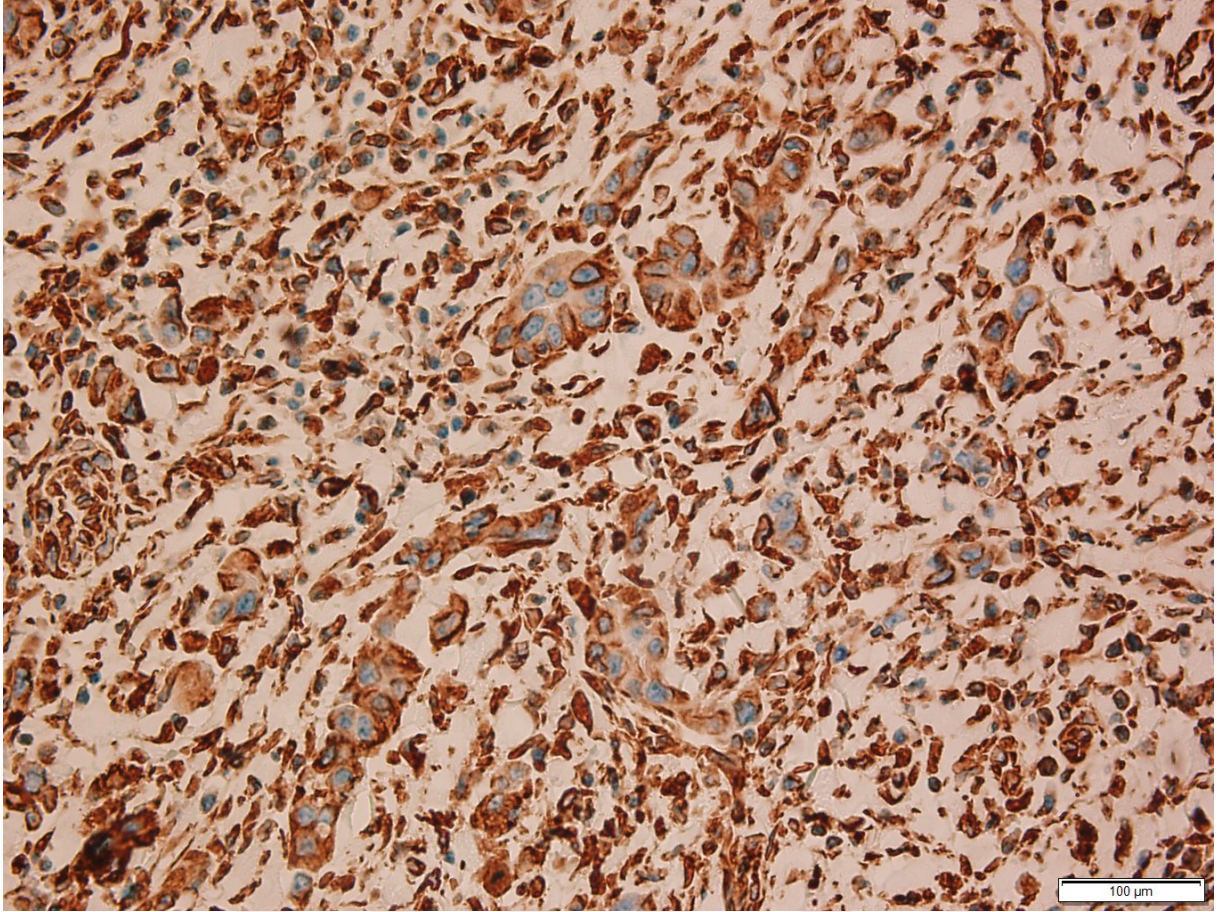
Resim 29: E-Cadherin kaybı, İHK x10

3.3.3 Vimentin ve Keratin Değerlendirilmesi

Tümör hücrelerinde vimentin ekspresyon yoğunluğu 0 (boyanma yok), 1 (%10'dan az boyanma) ve 2 (%10'dan fazla boyanma) olarak skorlanmıştır (Resim 30-31). Keratin ekspresyonu tomurcuklanma alanları gözetilerek incelenmiş 0 (kayıp var) ve 1 (kayıp yok) olarak skorlanmıştır.



Resim 30: Tümörde ve tomurcuklanma görülen hücrelerde vimentin negatifliği, İHK x10



Resim 31: Tümörde ve tomurcuklanan hücrelerde vimentin pozitifliği, İHK x10

3.4 İstatiksel Analiz

Elde ettiğimiz verilerin istatistiksel değerlendirmesi 'SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 27.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Kategorik veriler arasındaki ilişki Ki-Kare testi ile değerlendirildi. Değerlendirmelerde bağımsız örneklerde iki kategori arasındaki normal dağılım gösteren değişkenlerin karşılaştırılmasında T testi; normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılmasında Fisher'ın kesin olasılık testi kullanıldı. Sağ kalım ile ilişkinin belirlenmesinde Kaplan Meier Yaşam Analizi ve karşılaştırmalarda Log Rank testi kullanıldı. Sağkalımın çoklu yaşam analizinde de Cox regresyon modeli oluşturulmuştur. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3.5 GATA6'nın İn Silico Yöntemler ile Araştırılması

GATA6 insan kromozomunda 18q11.2 lokazisyonunda bulunmakta ve kanser gelişiminde çeşitli roller oynamaktadır. Pankreas kanserlerinde hem doğrudan hem de dolaylı bir mekanizma ile epitel ve mezenkimal transkripsiyon süreçlerini kontrol ettiği ve pankreas kanseri hücrelerinde EMT'yi önleyen tümör baskılayıcı bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir²³. Bu nedenle, çalışmamızda PDAK'ta, GATA6 amplifikasyonuna eşlik eden gen/genler alterasyonlarını saptamak için Cbioportal.org sitesindeki erişime açık veri tabanlarından (Pancreatic Adenocarcinoma ICGC, Nature 2012, Pancreatic Adenocarcinoma (QCMG, Nature 2016, Pancreatic Adenocarcinoma (TCGA, Firehose Legacy, Pancreatic Cancer (UTSW, Nat Commun 2015), Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (CPTAC, Cell 2021)) GATA6 mutasyonu olan olgular belirlenmiştir. Bu olgulara eşlik eden gen değişiklikleri ve artmış mRNA ekspresyonları in silico yöntemlerle analiz edilmiş ve istatistiksel anlamlılık gösteren genler genecards.org sitesi üzerinden araştırılıp EMT ile ilişkili olanları tespit edilmiştir. GATA6 gen değişikliklerine eşlik eden artmış mRNA ekspresyonları, farklı eksprese edilen genler (FEG) olarak kabul edilmiştir. GATA6 mutasyonlarına eşlik eden artmış FEG'lerin (differentially expressed genes, DEGs) istatistiksel olarak anlamlı olanları ile gprofiler aracı kullanılarak KEGG, Reactome ve Wikipathways üzerinden yolak zenginleştirme ve Gene Ontology Biological process (GO-BP) üzerinden ontolojik zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Bu analizler, istatistiksel anlamlı GATA-6 ilişkili tüm FEG'lerde ve log2 oranı 1'in üstü ile -1'in altı olan FEG'lerde ayrı ayrı uygulanmıştır. İstatistik anlamlılık düzeyi $q < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler ve Histopatolojik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen 100 PDAK tanılı hastanın 59'u erkek, 41'i kadındır. Hastaların ortalama yaşı 67.02 ± 9.10 (43-91 yaş) dur. Seksen yedi hastada (%87) pankreatoduodenektomi, 13 hastada (%13) distal pankreatektomi uygulanmıştır. Olguların %79'unda tümörün pankreas başına lokalize olduğu tespit edilmiştir. Tümör boyutu 2 hastada tümörün infiltratif paterni sebebi ile sağlıklı ölçülememiştir. Kalan 98 hastanın 11'inde ≤ 2 cm iken, 54 hastada 2 ile 4 cm arası, 33 hastada ise > 4 cm'dir ve 14 hastada tümör boyutu 5 cm'den büyük olarak ölçülmüştür ve ortalama boyut 3.80 ± 1.50 (0.9-8.5) cm'dir.

Tümör diferansiasyonu 69 hastada derece 1, 24 hastada derece 2 ve 7 hastada derece 3 olarak belirlenmiştir. Seksen dört hastada lenfovasküler invazyon ve 95 hastada perinöral invazyon saptanmıştır. Cerrahi sınır 53 hastada pozitif olup, 11 olguda pankreas rezeksiyon sınırında, 10 olguda medial cerrahi sınırda, 33 olguda ise retroperitoneal cerrahi sınırında tümör devamlılığı izlenmiştir. Operasyon materyallerinden ortalama 23.92 ± 10.12 (6-55 aralığında) lenf nodülü diseke edilmiş; bunların yaklaşık %30'unda metastaz saptanmıştır. Tümör evresi, 10 hastada pT1, 53 hastada pT2, 36 hastada pT3 ve 1 hastada pT4 olarak belirlenmiştir.

Olgulara ait klinikopatolojik özellikler Tablo 4'te, değerlendirilen morfolojik bulguların dağılımı ise Tablo 5'te verilmiştir.

Özellik (n:100)	Sıklık N (%)
Cerrahi operasyon tipi	100
Whipple	87
Distal pankreatektomi	13
Tümör Lokalizasyonu	
Baş	83
Gövde	12
Kuyruk	5

Tümör uzun çapı (cm) (min-max)	
≤ 2 cm (n%)	11 (11)
2<n≤ 4	54
> 4cm (n%)	33
Tümör Derecesi (n=100)	
G1	69
G2	24
G3	7
Perinöral invazyon	
Var	95 (95)
Yok	5
Lenfovasküler invazyon	
Var	84 (84)
Yok	6
Tümör Evresi	
pT1b	1
pT1c	9
pT2	53
pT3	36
pT4	1
Lenf nodu metastazı	
Var	17
Yok	83
Rekürrens/metastaz (n:58)	
Var	47
Yok	11
Sağ kalım(n:100)	
Sağ	16
Ölü	84

Tablo 4: Olgulara ait klinikopatolojik özellikler

Özellik (n:100)		Sıklık N (%)	Özellik (n:100)		Sıklık N (%)
İntratümöral tomurcuklanma	0-4	29	Stroma miktarı	Az	34
	5-9	30		Orta	60
	>9	41		Fazla	6
Peritümöral tomurcuklanma	0-4	29	Tümörüçi lenfosittik infiltrat	Hafif	95
	5-9	34		Belirgin	5
	>9	37			
Çevre asiner duktal metaplazi	Yok	35	Tümör çevresi lenfosittik infiltrat	Hafif	58
	Var	65		Belirgin	42
Apikal bazal hücre polarite kaybı	yok	51	Nekroz	Yok	63
	fokal	37		Var	37
	yaygın	12			
Mezenkimal Fenotip	Yok	53			
	Var	47			
Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu	Yok	39			
	Var	61			
İnkomplet gland	yok	52			
	fokal	42			
	yaygın	6			

Tablo 5: Olgulara ait morfolojik bulgular

4.2 İzlem Verileri

Olgularımızın ortalama takip süresi 27.16 aydır. Ellisekiz olguda tedavi ve takip verilerine ulaşılabilmektedir. Bunlardan 47 olguda (%81) metastaz veya nüks saptanmıştır.

Karaciğer metastazın en yaygın görüldüğü bölgedir (n = 23, %52.3). Karaciğer metastazının yanı sıra 17 hastada akciğer ve 18 hastada periton metastazı saptanmıştır. Dokuz olguda lokal nüks saptanmıştır. Seksen dört olgu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir ve ortalama sağkalım (OS, genel sağkalım) süresi 35.70 ± 4.96 aydır. Ortalama hastalıksız sağkalım (DFS) süresi ise 31.28 ± 7.12 aydır.

4.3 İmmunhistokimyasal Bulgular

Keratin tüm tümörlerde glandüler ve tomurcuklanma alanlarında pozitif olarak izlenmiştir. Altmış yedi olgu vimentin ile negatif boyanırken, yalnızca 12 hastada tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında boyanma görülmüştür. E-Cadherin ile tümörlerin 3 (%3)'ünde %10'dan az (yaygın kayıp), 47'sinde ise %10-90 arasında (fokal kayıp) boyanma izlenmiştir. LOXL2 'nin tümör epitelyal hücrelerinde ve stromal hücrelerdeki boyanması ayrı olarak değerlendirilmiştir. Yirmi beş olguda epitelyal boyanma görülürken 29 olguda stromal hücrelerde boyanma vardır. LOXL2 epitelyal boyanma ile stromal boyanma arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon izlenmiştir ($p=0,003$) ve 13 tümörde hem stromal hem epitelyal boyanma izlenmiştir. E-cadherin kaybı ile vimentin pozitifliği karşılaştırıldığında istatistiksel anlam bulunmamakla birlikte E-cadherin kaybı olan olgularda vimentin pozitifliği daha fazla görülmüştür ($p=0.288$). Veriler Tablo 6' da özetlenmiştir.

Özellik (n:100)		Sıklık N (%)
Keratin	Negatif	0
	Pozitif	100
Vimentin	Negatif	67
	<%10 pozitif	21
	>%10 pozitif	12
E-Cadherin	<%10 pozitif (yaygın kayıp)	3
	%10-90 pozitif (fokal kayıp)	47
	>%90 pozitif	50
LOXL2 stromal boyanma	0	71
	1(orta boyanma)	20
	2(belirgin boyanma)	9
LOXL2 epitelyal boyanma	0	75
	1 (zayıf boyanma)	22
	2 (zayıf-orta boyanma)	3

Tablo 6: İmmunhistokimyasal parametrelerin olgulara dağılımı

LOXL2 EPİTELYAL BOYANMASI			
		0 (boyanma yok)	1 (boyanma var)
LOXL2 stromal boyanma(p=0.003)	0	59(%83.1)	12(%16.9)
	1-2(orta/belirgin)	16(%55.2)	13(%44.8)

Tablo 7: LOXL2 stromal hücre ve epitelyal hücre boyanması arasındaki ilişki

4.4 Morfolojik Bulguların İmmunhistokimyasal Bulgularla İlişkisi

Morfolojik bulgular ile immünhistokimyasal verilerin ilişkisi değerlendirildiğinde: Tümör çevresi lenfositik infiltratın zayıf olduğu olgularda vimentin pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla görülmüştür ($p=0.036$) (Tablo 8). Nekroz izlenen tümörlerde E-Cadherin kaybı da daha fazla oranda görülmüştür ($p=0.007$) (Tablo 9). LOXL2'nin epitelde pozitif olduğu olgularda çevre pankreas parankiminde asiner duktal metaplazi görülme oranı daha yüksek bulunmuştur ancak yakın olmakla birlikte bu ilişki istatistiksel anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p=0.055$).

Vimentin ekspresyonu			
		POZİTİF	NEGATİF
Tümör çevresi lenfosit ($p=0.036$)	1	24(%72.7)	34(%50.7)
	2-3	9(%27.3)	33(%49.3)

Tablo 8: Vimentin ekspresyonu ile TÇLİ arasındaki ilişki

E-Cadherin kaybı			
		VAR	YOK
Nekroz ($p=0.007$)	Var	25(%50)	12 (%24)
	Yok	25(%50)	38(%76)

Tablo 9: E-Cadherin kaybı ile tümör nekrozu arasındaki ilişki

4.5 Morfolojik ve İmmunhistokimyal Bulguların Prognostik Parametreler ile İlişkisi

4.5.1 Morfolojik bulgular ve prognostik parametreler

Tümör tomurcuklanması ile LVİ, PNİ, lenf nodu metastazı ve evre arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. TT sayısı ile tümör diferansiyasyon kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ($p<0.001$). Yüksek düzeyde İTT gösteren

tümörlerin daha yüksek oranda orta-az diferansiye olduğu izlenmiştir ($p<0.001$). İyi diferansiye tümörlerde stroma miktarı daha fazla bulunmuş ($p=0.003$), ayrıca MP, TBHG ve nekroz da orta / az diferansiye tümörlerde daha yüksek oranda saptanmıştır (Tablo 9).

Tümörde inkomplet gland, nekroz, TBHG ve MP varlığı, ≥ 5 üzeri PTT içeren tümörlerde daha sık bulunmuştur ($p=0.030$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$)(Tablo 11). Bununla birlikte, ≥ 9 tomurcuk içeren tümörlerde, çevre pankreas dokusunda asiner duktal metaplazi ($p<0.001$) anlamlı olarak daha sık saptanmıştır (Tablo 12). İTT'nin yoğun olduğu tümörlerde MP, TBHG ve nekroz sıklığı da daha yüksek olarak bulunmuştur. (Tablo 13). Ayrıca İTT sayısı ≥ 9 olanlarda stroma miktarı daha az olarak bulunmuştur ($p=0.030$) (Tablo 14). TÇLİ, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, iyi diferansiye tümörlerde belirgin olarak izlenmiştir ($p=0.042$, $p=0.078$)

		Tümör Diferansiasyonu	
		İyi	Orta / az
İntratümöral Tomurcuklanma($p<0.001$)	0-4	27(%39.1)	2(%6.5)
	≥ 5	42(%60.9)	29(%93.5)
İntratümöral Tomurcuklanma ($p<0.001$)	0-9	51(%73.9)	8(%26.1)
	>9	18(%26.1)	23(%73.9)
Peritümöral Tomurcuklanma ($p=0.003$)	0-4	26(%37.7)	43(%62.3)
	≥ 5	3(%62.3)	28(%37.7)
Peritümöral Tomurcuklanma($p<0.001$)	0-9	52(%75.4)	17(%24.6)
	>9	11(%24.6)	20(%75.4)
Stroma miktarı ($p=0.003$)	Az	17(%24.6)	17(%54.8)
	Orta-Belirgin	52(%75.4)	14(%55.2)
Mezenkimal Fenotip ($p<0.001$)	Var	22(31.9)	25(%80.6)
	Yok	47(%68.1)	6(%19.4)

Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu (p=0.007)	Var	36(%52.2)	25(%80.6)
	Yok	33(%47.8)	6(%19.4)
Nekroz (p=0.042)	Var	21(%30.4)	16(%51.6)
	Yok	48(%69.6)	15(%48.4)

Tablo 10: Tümör diferansiasyonu ve araştırılan morfolojik parametrelerin ilişkisi

Peritümöral Tomurcuklanma			
		0-4	≥5
Mezenkimal Fenotip (p<0.001)	Var	1(%3.4)	46(%64.8)
	Yok	28(%96.6)	25(%35.2)
Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu (p<0.001)	Var	5(%17.2)	56(%78.9)
	Yok	24(%82.83)	15(%21.1)
Nekroz (p<0.001)	Var	2(%6.9)	35(%49.3)
	Yok	27(%93.1)	36(%50.7)
İnkomplet gland varlığı (p=0.030)	Var	9(%31)	39(%54.9)
	Yok	20(%69)	32(%45.1)

Tablo 11: Peritümöral Tomurcuklanma ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan morfolojik parametreler

Peritümöral Tomurcuklanma			
		0-9	>9
Asiner duktal metaplazi (p<0.001)	Var	2(%6.9)	35(%49.3)
	Yok	27(%93.1)	36(%50.7)

Tablo 12: Yüksek derecede PTT ile asiner duktal metaplazi varlığı ilişkisi

İntratümöral Tomurcuklanma			
		0-4	≥5
Mezenkimal Fenotip (p<0.001)	Var	1 (%3.4)	46 (%64.8)
	Yok	28 (%96.6)	25 (%35.2)
Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu (p<0.001)	Var	6 (%20.7)	55 (%77.5)
	Yok	23 (%79.3)	16 (%22.5)
Nekroz (p=0.002)	Var	4 (%13.8)	33 (%46.5)
	Yok	25 (%86.2)	38 (%53.5)

Tablo 13: İTT ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametreler

İntratümöral Tomurcuklanma			
		0-9	>9
Stroma miktarı (p=0.030)	Az	15(%25.4)	19(%46.3)
	Orta-Belirgin	44(%74.6)	22(%53.7)

Tablo 14: Yüksek dereceli intratümöral tomurcuklanma ile stroma ilişkisi

Lenfovasküler invazyonu (LVI) olan ve cerrahi sınırı pozitif olgularda MP daha yüksek oranda izlenmiştir ($p=0.048$, $p=0.014$). **(Tablo 15)** TİLİ ve TÇLİ prognostik parametrelerin hiçbirisi ile istatistiksel olarak anlam göstermemiştir. İnkomplet gland ve TBHG ile prognostik parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Lenfovasküler invazyon			
		Var	Yok
Mezenkimal Fenotip ($p=0.048$)	Var	43(%51.2)	4(%25)
	Yok	41(%48.8)	12(%75)

Tablo 15: Lenfovasküler invazyon ile MP arasındaki ilişki

4.5.2 İmmunhistokimyasal Bulgular ve Prognostik Parametreler

İmmunhistokimyasal bulgulardan klinikopatolojik parametrelerle istatistiksel anlamlı ilişkisi olanlar Tablo 15 'te gösterilmektedir. Buna göre: Tümörde vimentin pozitifliği ve LOXL2 stromal boyanması ile pT evresi arasında anlamlı ilişki vardır ve pozitif tümörlerin pT evresin daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p=0.027$, $p=0.009$) (Tablo 16). Tümör diferansiasyonu ile E -Cadherin kaybı ve vimentin pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. E-Cadherin kaybı ve vimentin pozitifliği az diferansiye tümörlerde daha fazla izlenmekle birlikte bu ilişkinin istatistiksel anlamlılık düzeyine erişmediği gözlenmiştir ($p=0.130$, $p=0.203$). LOXL2 stromal boyanması açısından iyi ve az diferansiye tümörler arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ayrıca cerrahi sınır pozitifliği, perinöral ve lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı varlığı ile de E-Cadherin kaybı ve Vimentin ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır. LOXL2 epitelyal boyanması ile prognostik parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

EVRE			
		pT1-2	pT3-4
Vimentin (p=0.027)	Pozitif	26(%41.3)	7(%19.4)
	Negatif	34(%58.7)	29(%81.6)
LOXL2 stromal boyanma (p=0.009)	1-2: orta-belirgin	24(%38.1)	5(%13.9)
	0: negatif	39(%61.9)	31(%86.1)

Tablo 16: Evre ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan immünohistokimyasal parametreler

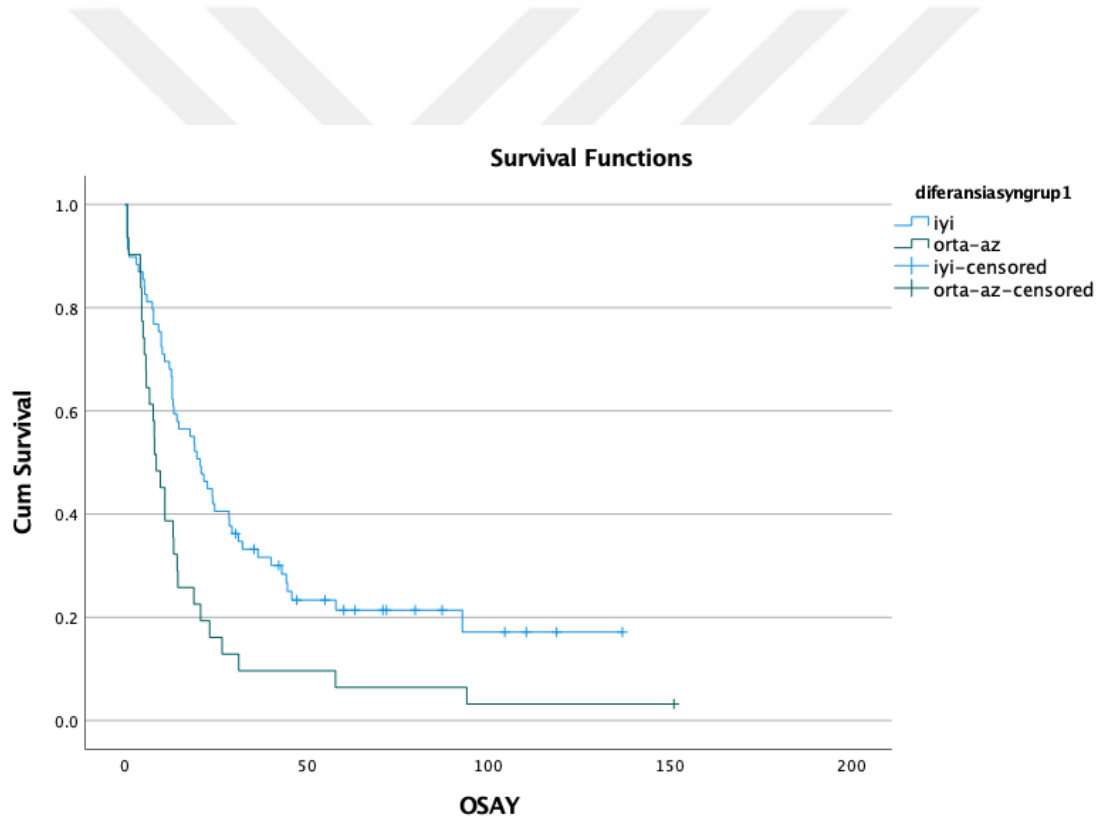
4.6 Bulguların sağkalım ile ilişkisi

Lenfovasküler invazyonu olan ($p = 0,010$), az diferansiye tümöre sahip ($p = 0,014$) ve cerrahi sınır pozitifliği ($p < 0,001$) görülen hastalarda mortalite oranının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. PNI ($p = 0.180$), evre ($p = 0.091$), lenf nodu metastazı ($p = 0.098$), tümör lokalizasyonu ve metastaz yeri ölüm oranıyla ilişkili değildir. Morfolojik ve immünohistokimyasal bulgulara baktığımızda; İTT/PTT, MP, TBHG, nekroz ve e-kadherin kaybının yüksek olduğu hastalarda ölüm oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.012$, $p = 0.011$, $p = 0.027$, $p = 0.013$, $p = 0.035$, $p = 0.027$). Stroma miktarı, ABHPK, TÇLİ, TİLİ, inkomplet gland, vimentin ve LOXL2 ekspresyonu ile mortalite arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

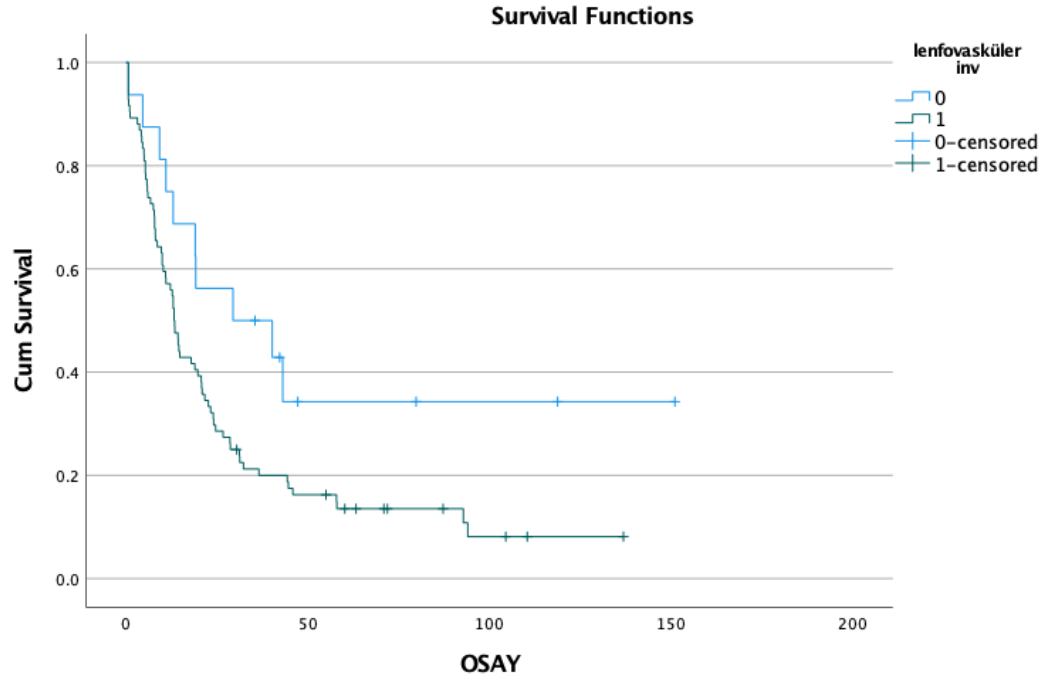
Serimizde nüks verisi bulunan 58 hastaya yapılan istatistiksel analizde nüks oranıyla anlamlı ilişki gösteren parametre ileri pT evresidir ($p = 0,010$). Serimizde ileri evre (pT3-T4) olan 18 hasta, düşük evre (pT1, T2) 40 hasta vardır. Tümör diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, LVI, PNI ve cerrahi sınır pozitifliği nüks oranları ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamıştır.

Nüks ve morfolojik bulguların ilişkisine baktığımızda; MP varlığının, nüks görülen hastalarda daha fazla olduğu, istatistiksel anlamlılığa yakın olmakla birlikte, anlamlı değerin üzerinde kalmıştır ($p = 0.089$). Tomurcuklanma dahil diğer morfolojik parametreler ile nüks arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

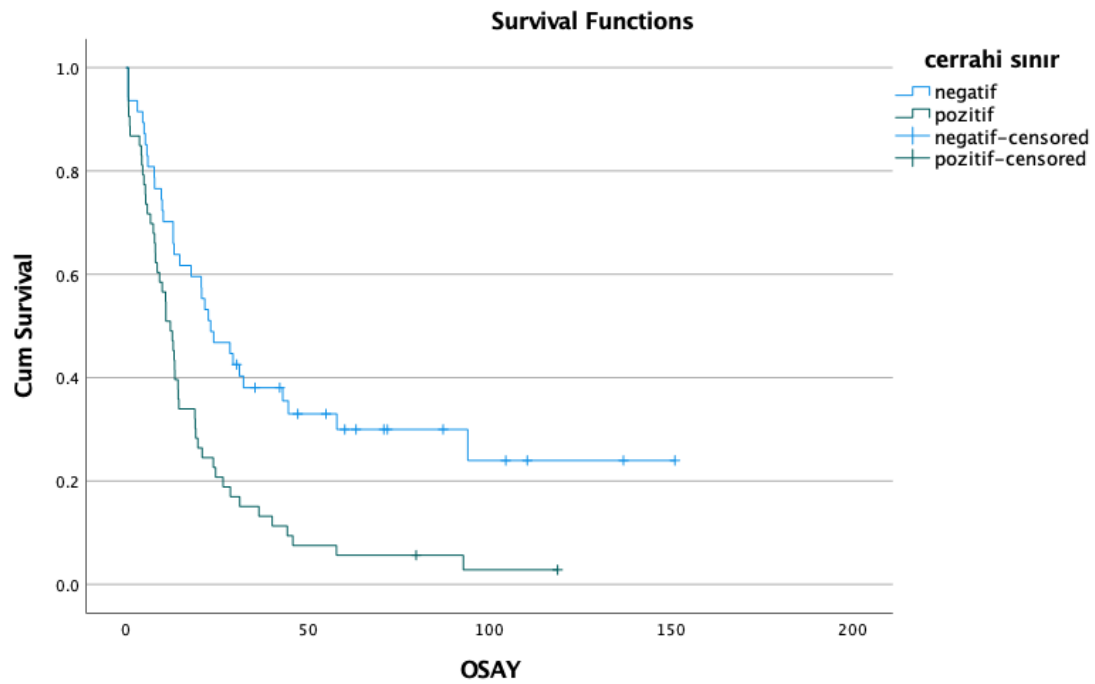
Klinikopatolojik parametrelerin sağkalım ile anlamlı istatistiksel ilişkisi olanları **Tablo 17**'de gösterilmiştir. Buna göre: diferansiasyon derecesi yüksek (log rank, $p=0.002$), cerrahi sınırı pozitif (log rank, $p<0.001$) ve lenfovasküler invazyonu olan ($p=0.037$) olgularda sağkalım süresinin daha kısa olduğu saptanmıştır (Şekil 1-3). Perinöral invazyon($p=0.180$), evre ($p=0.091$), lenf nodu metastazı($p=0.098$), tümör lokalizasyonu ve metastaz yeri ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.



Şekil 1: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Tümör diferansiasyonu sağkalım ilişkisi.



Şekil 2: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Lenfovasküler invazyon sağkalım ilişkisi.



Şekil 3: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Cerrahi sınır sağkalım ilişkisi.

Değişken	n	Ortalama sağkalım (ay)	p değeri
Tümör Diferansiasyonu			
İyi	69	20.60	0,002
Orta-Az	31	8.46	
Lenfovasküler İnvazyon			
Var	84	29.33	0,037
Yok	16	64.94	
Cerrahi Sınır Pozitifliği			
Pozitif	53	19.51	<0,001
Negatif	47	54.47	

Tablo 17: Sağ kalımla ilişkili bulgular

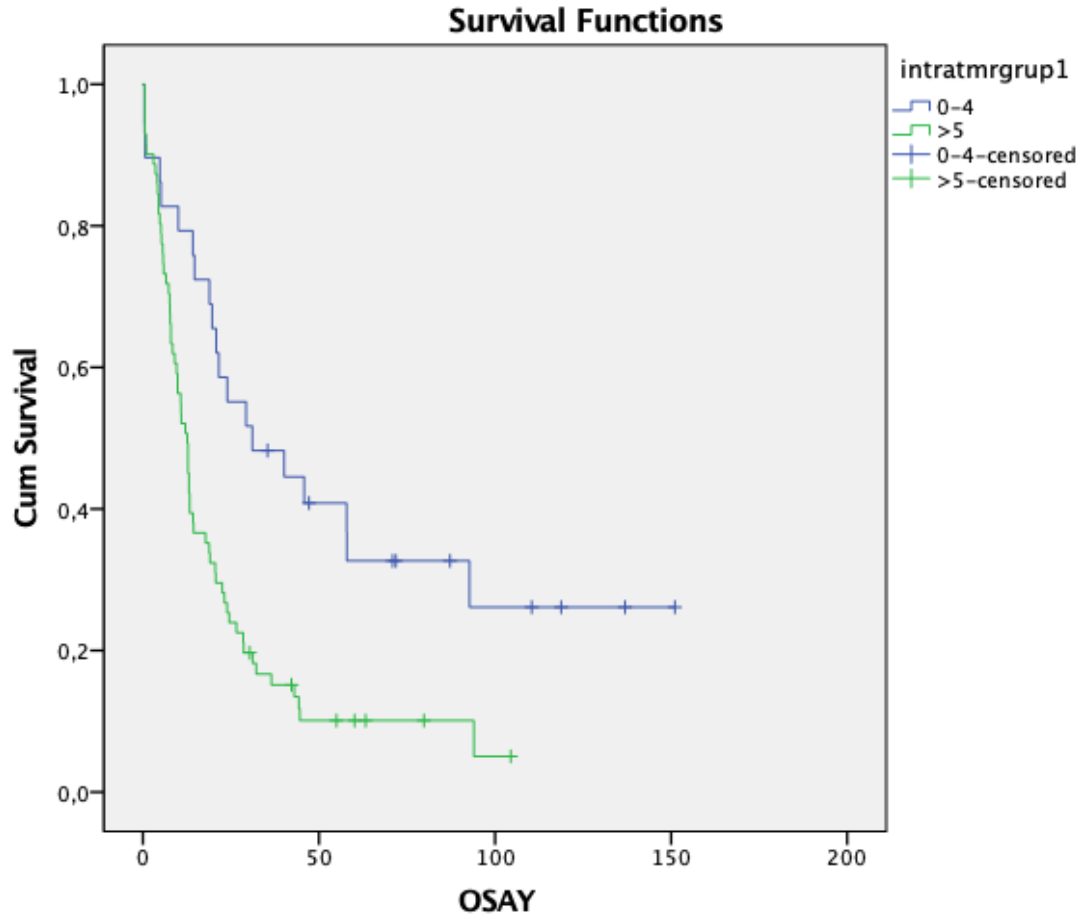
Sağ kalım ile morfolojik ve immunhistokimyasal parametrelerin ilişkisi Tablo 18 'de gösterilmiştir.

		Sağkalım		Nüks	
		sağ	ölü	var	yok
İntratümöral Tomurcuklanma	0-4	9(%56.3)	20(%23.8)	13(%27.7)	5(%45.5)
	≥5	4(%43.7)	64(%76.2)	34(%72.3)	6(%54,5)
İntratümöral Tomurcuklanma	0-9	14(%87.5)	45(%53.6)	27 (%57.4)	8(%72.7)
	>9	2(%12.5)	39(%46.4)	20 (%42.6)	3(%27.3)
Peritümöral Tomurcuklanma	0-4	7(%43.8)	22(%26.2)	12(%25.5)	4 (%36.4)
	≥5	9(%56.2)	62(%73.8)	35(%74.5)	7 (%64,6)
Peritümöral Tomurcuklanma	0-9	14(%87.5)	49(%58.3)	28(%59.6)	7 (%64.6)
	>9	2(%12.5)	35(%42.7)	19(%40.4)	4 (%36.4)
Stroma miktarı	Az	3(%18.8)	31(%36.9)	18(%38.3)	3 (%27.3)
	Orta	13(%81.2)	53(%63.1)	29(%61.7)	8 (%73.7)

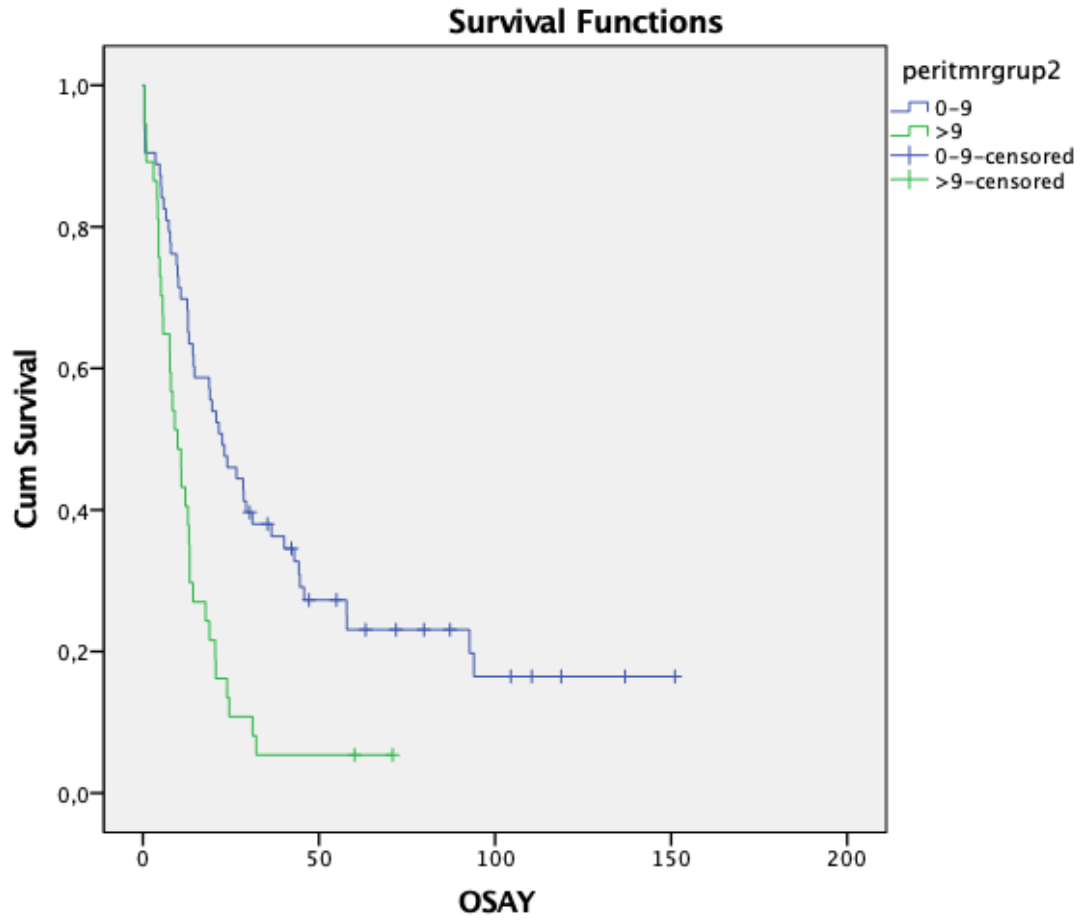
	Belirgin				
Tümör içi lenfositik infiltrat	1 2-3	14(%87.5) 2(%12.5)	81(%96.4) 3(%3.6)	44(93.6) 3(6.4)	10(%90.9) 1(%9.1)
Tümör çevresi lenfositik infiltrat	1 2-3	8(%50) 8(%50)	50(%59.5) 34(%40.5)	26(%55.3) 21(%44.7)	5 (%45.5) 6 (%55.5)
Çevre asiner duktal metaplazi	Var Yok	7(%43.8) 9(%56.2)	58(%69) 26(%31)	30(%63.8) 17(%36.2)	8(%72.7) 3(%27.3)
Apikal-bazal hücre polarite kayıbı	Var Yok	8(%50) 8(%50)	41(%48.8) 43(%51.2)	24(%51.5) 23(%48.5)	7 (%63.6) 4 (%36.4)
Mezenkimal Fenotip	Var Yok	3(18.8) 13(%81.2)	44(%52.4) 40(%47.6)	26(%55.3) 21(%44.7)	3 (%27.3) 8 (%72.7)
İnkomplet gland varlığı	Var Yok	5(%31.3) 11(%68.7)	43(%51.2) 41(%48.8)	21(%44.7) 26(%55.3)	4 (%36.4) 7 (%63.6)
Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu varlığı	Var Yok	6(%37.5) 10(%62.5)	55(%65.5) 29(%34.5)	29(%61.7) 18(%38.3)	5 (%45.5) 6(%54.5)
Nekroz	Var Yok	2(%12.5) 14(%87.5)	35(%41.7) 49(%58.3)	20(%42.6) 27(%57.4)	2 (%18.9) 9(%81.1)
E-Cadherin	%0-90 pozitif >90 pozitif	4(%25) 12(%75)	46(%54.8) 38(%45.2)	26(%55.3) 21(%44.7)	6 (%54.5) 5(%45.5)
Vimentin	Pozitif Negatif	3(%18.8) 13(%81.2)	30(%35.7) 54(%64.3)	13(%27.7) 34(%72.3)	4(%36.4) 7(%63.6)
LOXL2 stromal boyanma	Pozitif Negatif	5(%31.3) 11(%62.7)	24(%28.6) 60(%71.4)	16(%34) 31(%66)	3(%27.3) 8(%72.7)
LOXL2 epitelyal boyanma	Pozitif Negatif	4(%25) 12(%75)	21(%25) 63(%75)	11(%23.4) 36(%86.6)	3(%27.3) 8(%72.7)

Tablo 18: Morfolojik ve immnuhistokimyasal bulguların nüks ve sağ kalım ile ilişkisi

Sağ kalım analizlerinde, morfolojik bulgulardan istatistiksel olarak anlamlı olan parametreler: İntratümöral ve peritümöral yüksek düzeyde tomurcuklanma gösteren tümörü olan hastalarda beklenen sağ kalım süresi daha kısa olarak saptanmıştır. (log rank, $p<0.001$) (şekil 4-5).

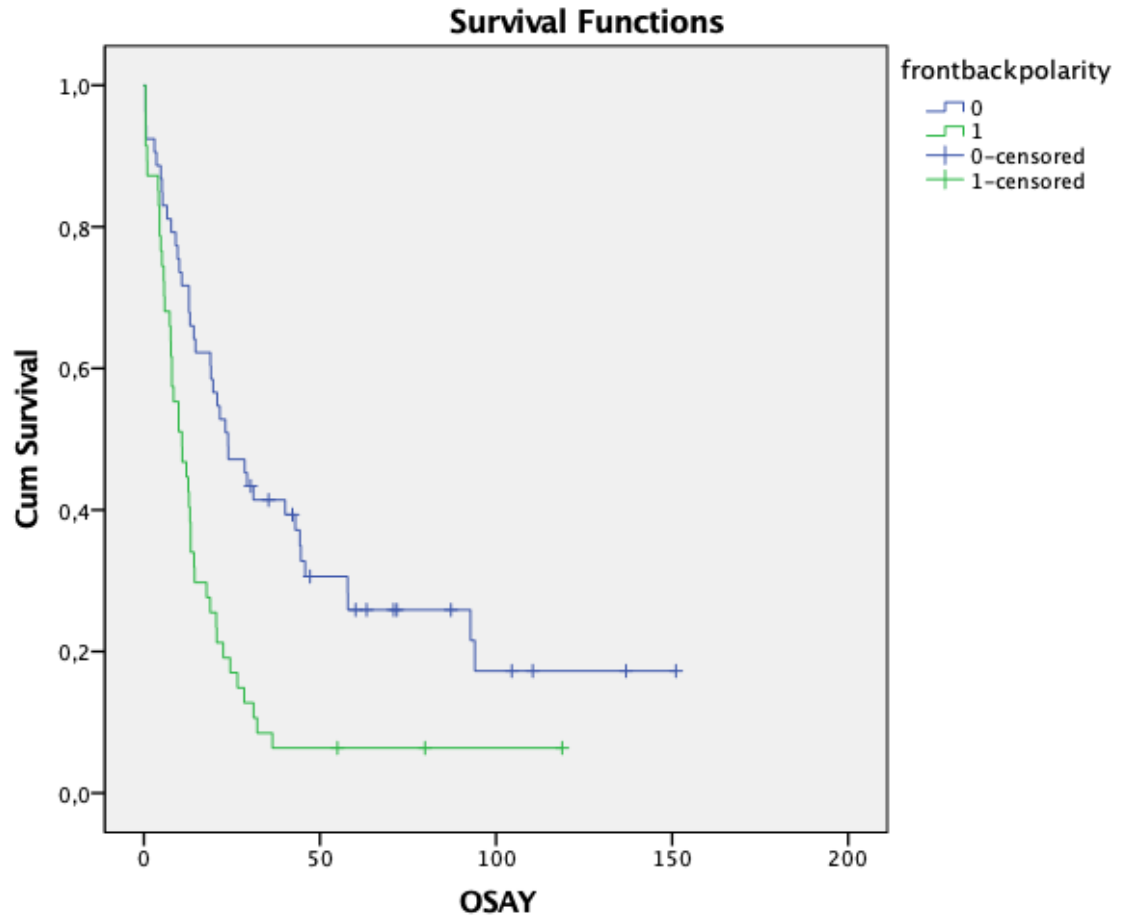


Şekil 4: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: İTT sağkalım ilişkisi.

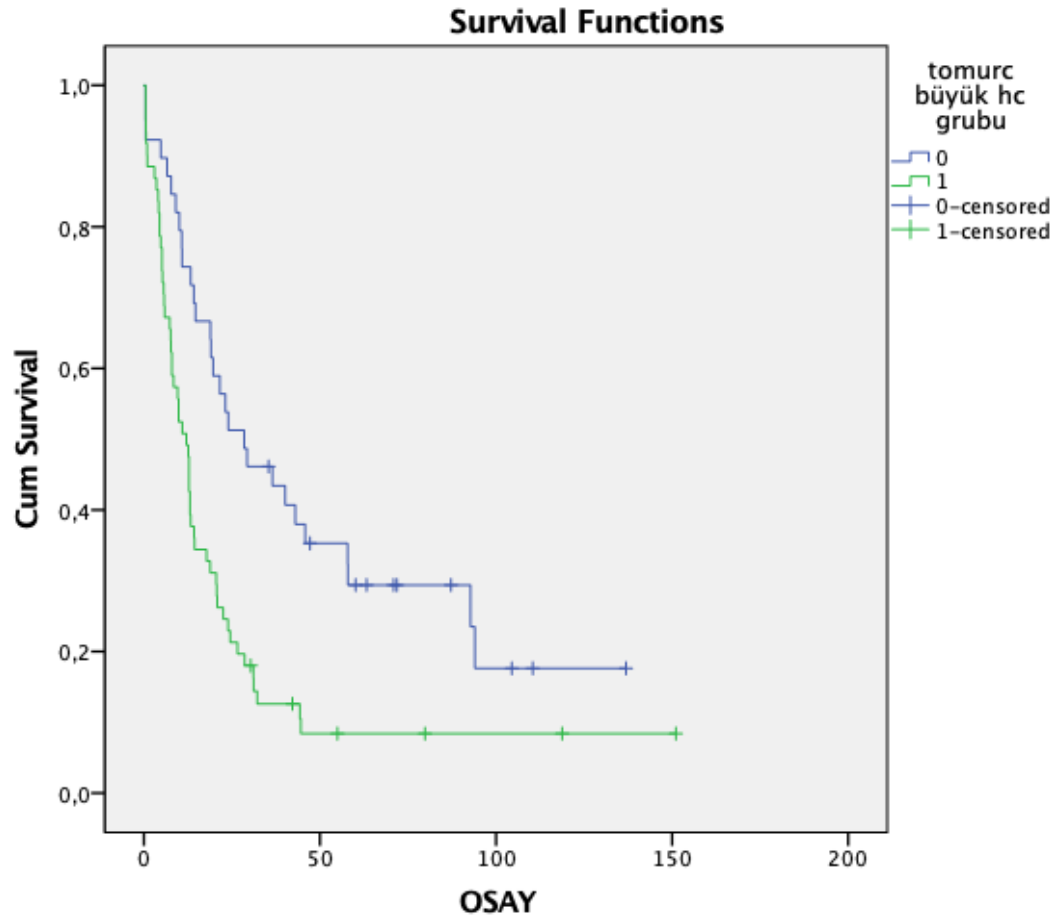


Şekil 5: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: PTT ile sağkalım süresi.

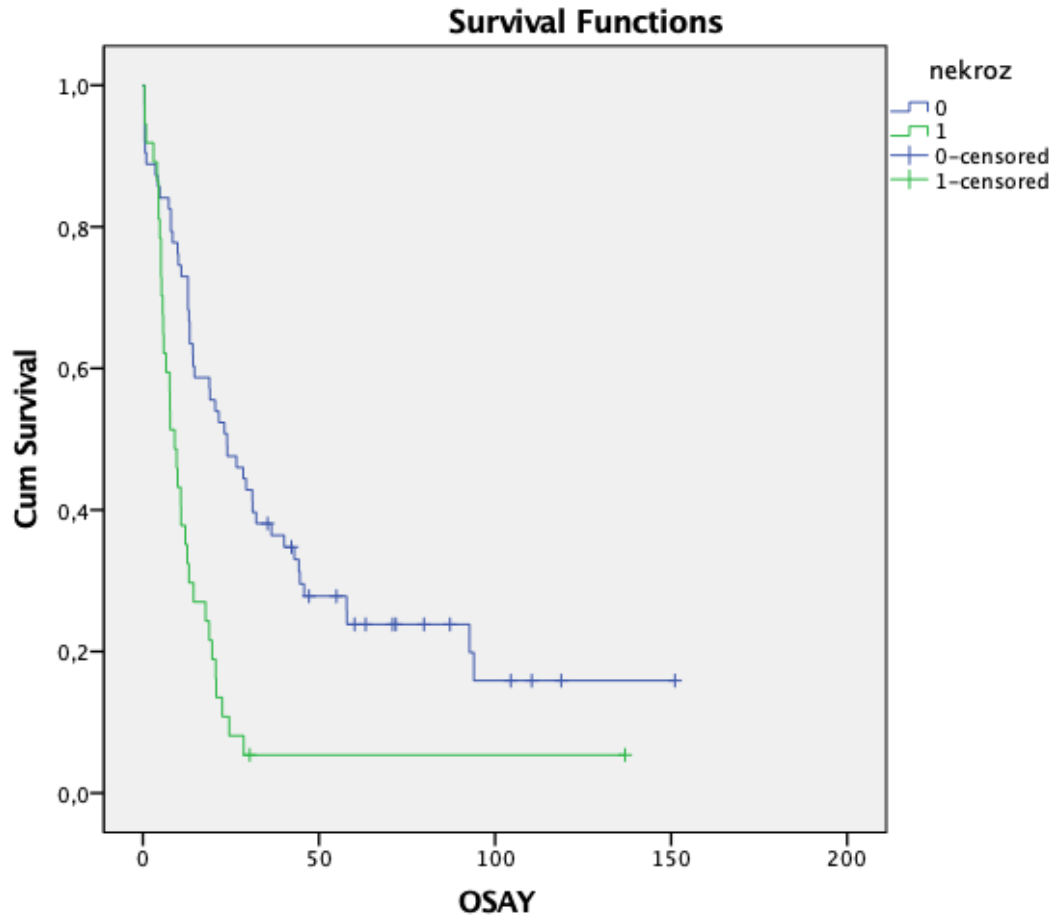
Ayrıca genel sağ kalım, MP (49.19' a karşı 18.72 ay), TBHG (50.44'e karşı 24.66 ay), nekroz (46.55'e karşı 17.18 ay) ve E-Cadherin kaybı saptadığımız olgularda anlamlı derecede daha kısa olarak saptanmıştır (log rank sırasıyla, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.028$) (Tablo 19).



Şekil 6: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Mezenkimal fenotip ile sağkalım ilişkisi



Şekil 7: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: TBHG ile sağkalım ilişkisi



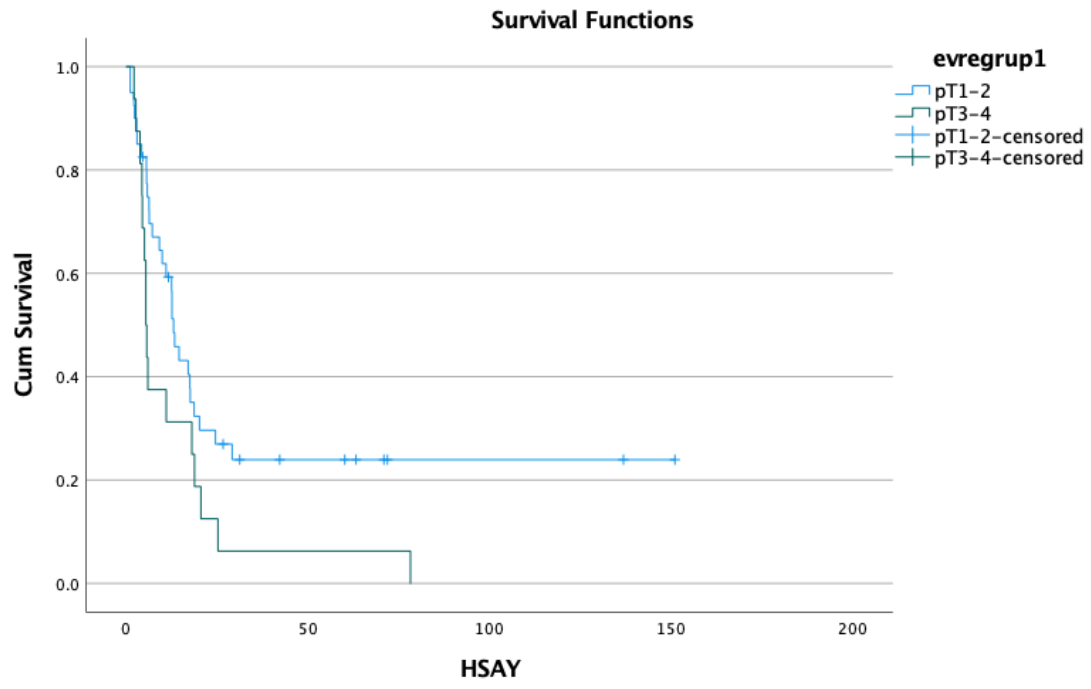
Şekil 8: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Nekroz ile sağkalım süresi.

Çevre pankreas parankiminde incelediğimiz ADM ise istatistiksel olarak anlamlı değere yakın bulunmuştur. ÇADM varlığı kısa sağ kalım süreleriyle ilişkili görülmüştür (log rank, $p=0.056$). Bunun dışında TİLİ, TÇLİ ve ABHPK ile sağ kalım arasında istatistiksel anlam izlenmemiştir.

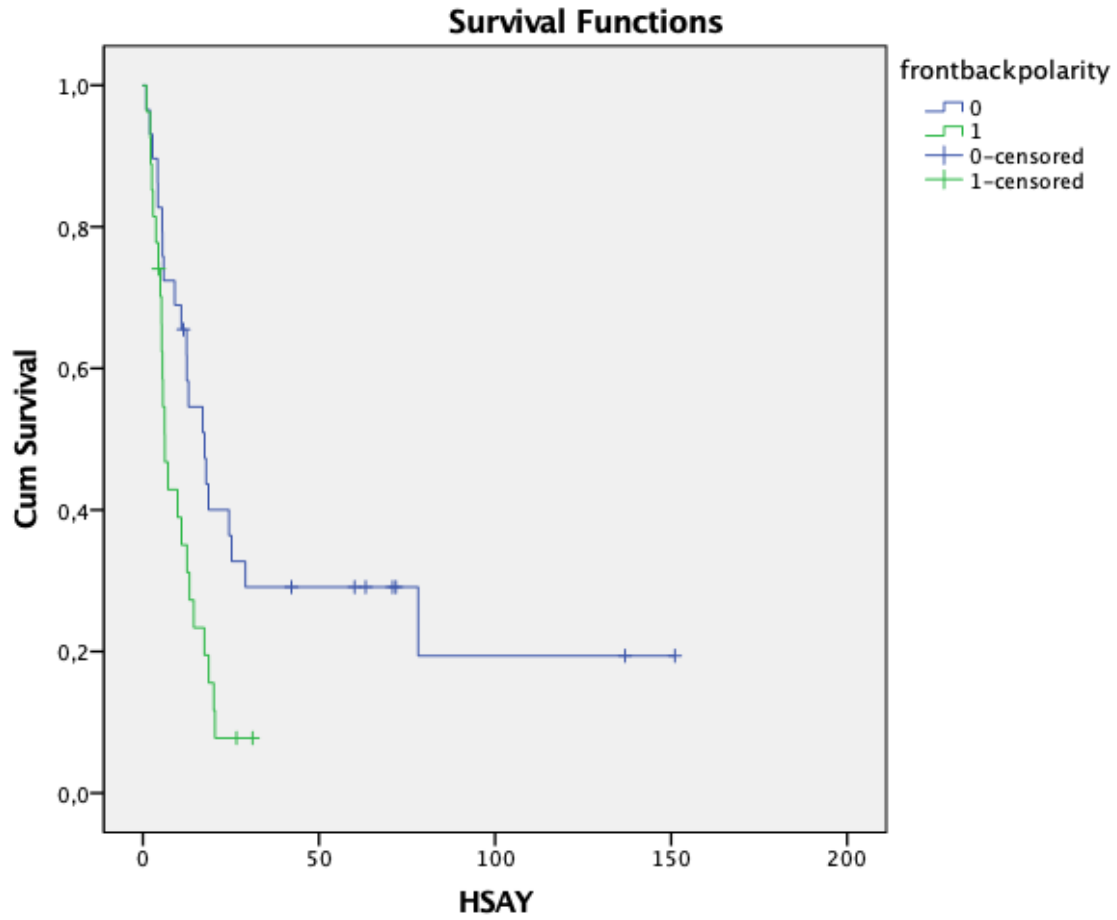
		Sağ	Ölü	Ortalama sağkalım (ay)	P değeri
İntratümöral	0-4	9(%56.3)	20(%23.8)	60.95	p<0.001
Tomurcuklanma	≥5	4(%43.7)	64(%76.2)	22.47	
İntratümöral	0-9	14(%87.5)	45(%53.6)	47.55	p<0.001
Tomurcuklanma	>9	2(%12.5)	39(%46.4)	17.70	
Peritümöral	0-9	14(%87.5)	49(%58.3)	46.15	p<0.001
Tomurcuklanma	>9	2(%12.5)	35(%42.7)	14.27	
Mezenkimal Fenotip	Var	3(18.8)	44(%52.4)	18.72	p<0.001
	Yok	13(%81.2)	40(%47.6)	49.29	
Tomurcuklanmadan büyük hücre grubu varlığı	Var	6(%37.5)	55(%65.5)	24.66	p<0.001
	Yok	10(%62.5)	29(%34.5)	50.44	
Nekroz	Var	2(%12.5)	35(%41.7)	17.18	p<0.001
	Yok	14(%87.5)	49(%58.3)	46.55	
E-Cadherin	%0-90 pozitif	4(%25)	46(%54.8)	24.76	p=0.028
	>90pozitif	12(%75)	38(%45.2)	45.95	

Tablo 19: Sağ kalım ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan parametreler

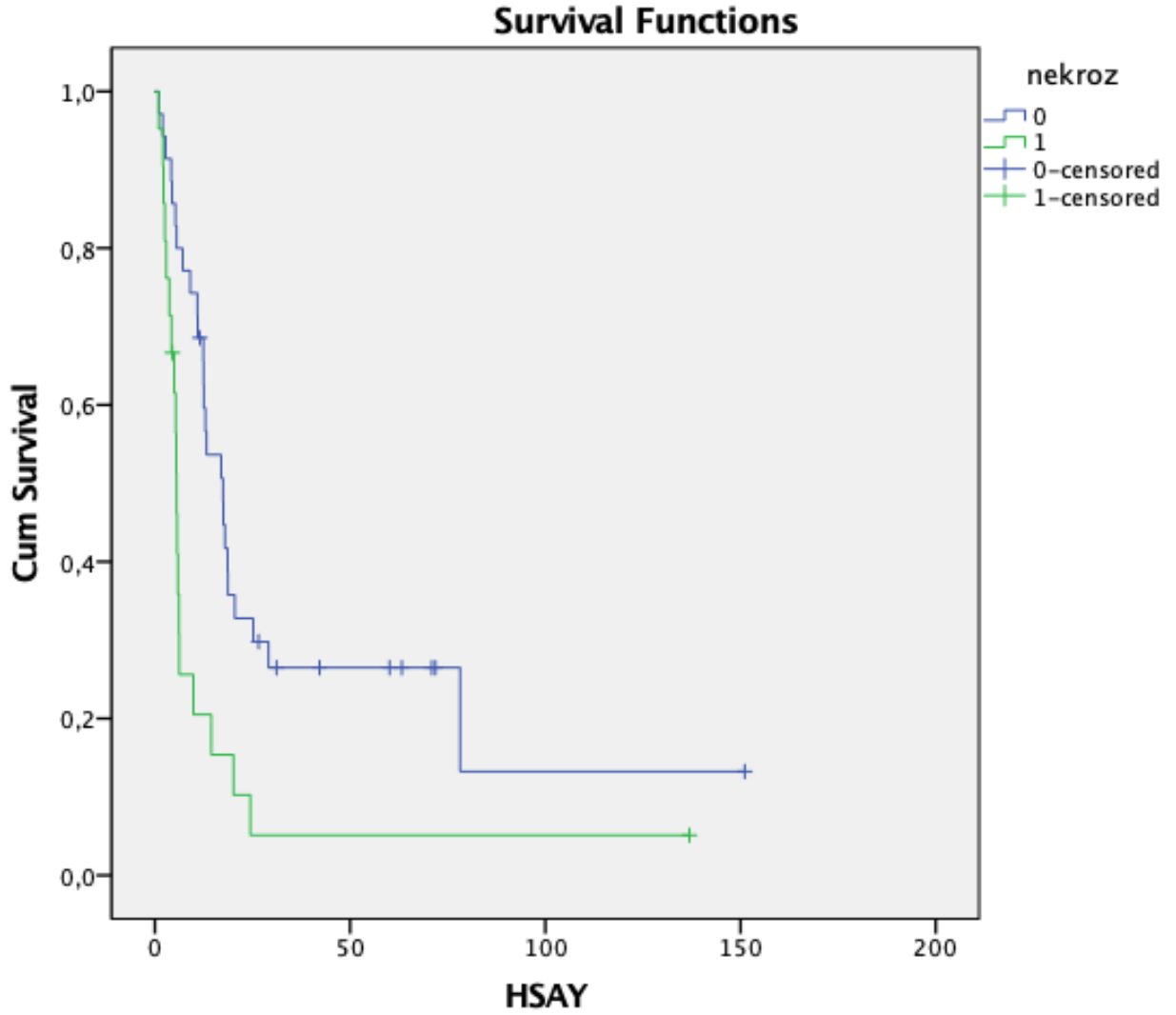
Hastalıksız sağ kalım ise ileri evre (log rank: p=0.045), MP (45.53'e karşı 10.33 ay) ve nekrozu (39.63'e karşı 13.79 ay) olan tümörlü hastalarda anlamlı ölçüde daha kısa olarak izlenmiştir (log rank, p=0.012, p=0.002) İntratümöral yüksek tomurcuklanma skoru gösteren tümörlü hastalarda, hastalıksız sağ kalım daha kısa olarak saptanmakla birlikte istatistiksel anlamlı düzeyde değildir. (log rank, p=0.090, p=0.056).



Şekil 9: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Tümör evresi ile hastalıksız sağkalım süresi.

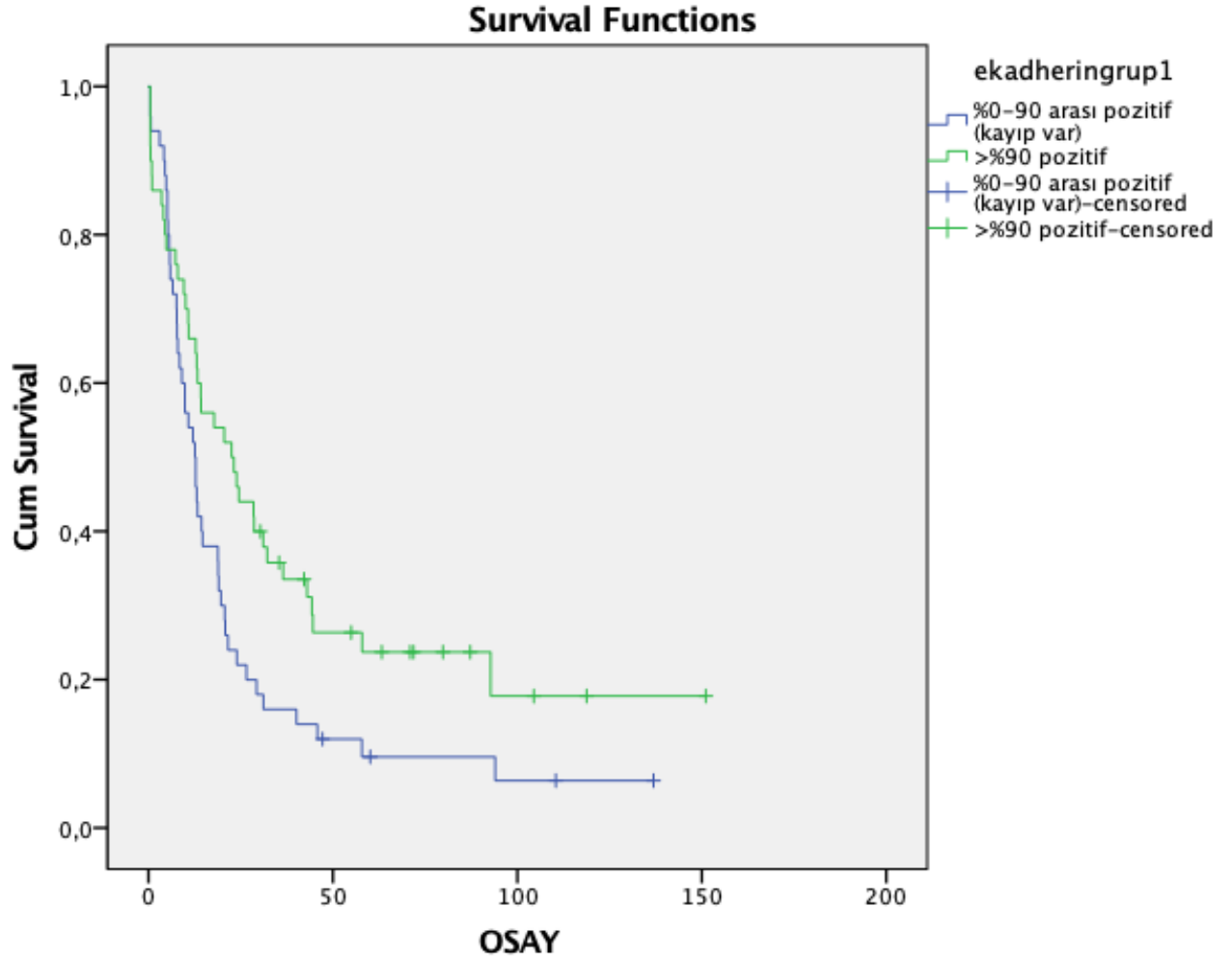


Şekil 10: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Mezenkimal fenotip ile hastalıksız sağkalım süresi. MF görülmeyen olgularda hastalıksız sağ kalım 45.53 iken, görülen hastalarda bu süre yalnızca 10.33’tü (log rank, $p=0.012$).



Şekil 11: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: Nekroz ile hastalıksız sağkalım süresi. Nekroz görülmeyen olgularda ortalama yaşam süresi 39.63, nekroz görülen olgularda ise 13.79'du (log rank, $p=0.002$).

İmmunhistokimyasal bulguların sağ kalımla ilişkisine bakıldığında, E-Cadherin kaybı görülen hastalarda sağ kalım (45.95'e karşı 24.76 ay) daha kısa olarak saptanmıştır (log rank, $p=0.028$). Vimentin ve LOXL2 ayrı ayrı değerlendirildiğinde her iki parametrenin de genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım ile istatistiksel anlamlı ilişkisi saptanmamıştır.



Şekil 12: Kaplan–Meier sağkalım eğrisi: E-kadherin kaybı ile sağkalım süresi.

Lojistik regresyon analizinde; yüksek İTT, yüksek PTT, MP, TBHG, nekroz ve belirgin E-kaderin kaybı varlığı ortak değişkenleri ile oluşturulan çok değişkenli modellerde hem mortalite hem de nüks açısından istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Cox regresyon analizinde yüksek İTT, yüksek PTT, TBHG, nekroz ve belirgin E-kaderin kaybı varlığı ortak değişkenleri ile oluşturulan çok değişkenli modelde, nekroz varlığı genel sağkalım açısından bağımsız negatif prognostik faktör olarak saptandı (HR 1.806, %95 GA: 1.085 ile 3.006 arası, $p=0.023$). Benzer şekilde nekroz varlığı hastalıksız sağkalım için de bağımsız negatif prognostik faktör olarak saptandı (HR 2.202, %95 GA: 1.165 ile 4.159 arası, $p=0.015$).

4.7 GATA6 Gen Değişiklikleri ve EMT İlişkisi

Cbioportal.org sitesinde PDAK çalışmalarına ait 5 veri tabanında, GATA6 gen analizi yapılan toplam 916 hasta bulunmuştur^{79,80,81}. Bu hastaların 52'sinde (%6) GATA6 gen değişiklikleri izlenmiştir. Hastaların 44'ünde (%84.6) artmış kopya sayısı değişiklikleri, 5'inde (%9.7) önemi bilinmeyen missense mutasyon, 2'sinde (%3.8) önemi bilinmeyen deep delesyon, 1'inde(%1.9) inframe mutasyon görülmüştür.

GATA6 alterasyonu görülen 52 hastanın sadece 27'sinde genel sağ kalım bakılmıştır. Takip süresi 59.76 aydır. Alterasyon olan grupta ortalama genel sağ kalım süresi 20.34 ay iken GATA6 alterasyonu olmayan grupta, 158 hastada genel sağ kalım 19.81 ay olarak hesaplanmış ve istatistiksel anlam görülmemiştir (q=0.402).

Hastaliksız sağ kalım, istatistiksel anlam olmaksızın GATA6 alterasyonu gösteren 19 hastada bakılmış ve ortalama 14.95 ay olarak bulunmuştur. Alterasyon olmayan grupta ise 122 hastada bakılmış ve ortalama hastaliksız sağ kalım süresi 17.05 ay olarak izlenmiştir (q=0.403).

GATA6 alterasyonu gösteren hastaların 35'i (%67.31) beyaz ırktır ve bu hastalarda GATA6 gen değişikliklerine eşlik eden 17015 gen izlenmiş olup bunlardan istatistiksel anlamı olan ve kopya sayısı değişikliği gösteren 313 gen görülmüştür. 313 gen içerisinde EMT yolakları ile ilişkili 4 gen bulunmuştur. Genlerin, GATA6 ile ilişkisi Tablo 20'de gösterilmiştir.

Gen	Sitoband	GATA6 değişiklikleri görülen grup	Alterasyon görülmeyen grup	q değeri
ROCK1	18q11.1	20 (43.48%)	21 (5.43%)	2.12e-8
RALBP1	18p11.22	6 (13.04%)	3 (0.56%)	1.461e-3
LINC00668	18p11.31	7 (15.22%)	2 (0.81%)	3.432e-3
GRB2	17q25.1	5 (26.32%)	7 (2.82%)	0.0180

Tablo 20: GATA6 kopya sayısı değişiklikleri ve EMT yolakları ile ilişkili genler

Gprofiler aracı üzerinden yapılan zenginleştirme analizlerinde, GATA6 gen değişikliklerine eşlik eden istatistiksel anlamlı artmış 593 FEG görülmüştür. GATA6 gen değişikliği olmayan grupta (non-altere) artmış olan 541 FEG görülmüştür. İstatistiksel

anlamalı olan FEG'lerden log2 oranı 1'in üstünde olan 82 FEG, -1'in altında olan ise 53 FEG vardır. İlgili bulgular Tablo 21, 22 ve 23'te gösterilmiştir.

Biyolojik süreci (BP), (Gen Ontolojisi (GO)), (term ID)	p _{adj} değeri
Epitel gelişimi (GO:0060429)	9.291×10 ⁻⁶
Hücre-hücre bağlantı organizasyonu (GO:0007043)	3.818×10 ⁻³
Hücre adezyonu (GO: 0007155)	1.640×10 ⁻⁷
Hücre-hücre yapışması (GO: 0098609)	1.950×10 ⁻²

Tablo 21: Artmış FEG'lerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler

Biyolojik Yollar (KEGG, Reactom, Wikipathways) (term ID)	p _{adj} değeri
Sıkı bağlantı (KEGG:04530)	1.025×10 ⁻³
Hücre bağlantı organizasyonu (REAC:R-HSA-421270)	1.959×10 ⁻²
Hücre Hücre iletişimi (REAC:R-HSA-1500931)	1.362×10 ⁻²
Pankreas kanser alt türleri (WP:WP5390)	7.251×10 ⁻⁸
Kolorektal kanserlerde EMT (WP:WP4239)	3.122×10 ⁻²

Tablo 22: Artmış FEG'lerin ilişkili olduğu biyolojik yollar

GATA6 mutasyonu olan grupta farklı ekspresyonu olan FEG'ler daha çok şu yolaklarla ilişkilidir; sıkı bağlantı (tight junction), hücre bağlantı organizasyonu (tight junction organization), hücre-hücre iletişimi (cell-cell communication), pankreas kanser alt türleri, kolorektal kanserlerde epitelyal mezenkimal geçiş. FEG'lerin ontolojik zenginleştirmesinde görülen biyolojik süreçler ise; epitelyal gelişim, hücre adezyonu ve hücre-hücre bağlantı organizasyonudur.

GATA6 mutasyonu olan grupta azalmış FEG'lerde, istatistiksel tek anlamlı bulgu, ontolojik zenginleştirme analizinde görülen "DNA tamir" biyolojik sürecidir.

Log2 oranı 1'in üstünde olan FEG'lerde yapılan yolak ve ontolojik zenginleştirme analizinde istatistiksel anlamlı görülen yolak, pankreas kanserinde klasik ve bazal alt tiplendirme; istatistiksel anlamlı görülen biyolojik süreç ise epitelyal tabakanın korunması'dır.

Gen ontolojisi/Biyolojik yollar	p _{adj} değeri
Pankreas kanserinde subtiplendirme (WP:WP5390)	4.508×10 ⁻¹³
Epitelyal tabakanın korunması (GO:0010669)	7.674×10 ⁻³

Tablo 23: Log2 oranı 1'in üstünde olan FEG'lerin istatistiksel anlamlı olduğu biyolojik yollar

Log2 oranı -1'in altında olan FEG'lerde yapılan yolak ve ontolojik zenginleştirme analizinde istatistiksel anlamlı görülen yollar: nikotin bağımlılığı ve insülin metabolizması olup istatistiksel anlamlı görülen biyolojik süreçler ise iyon transportu ve hücreler arası haberleşme'dir.

5. TARTIŞMA

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK), dünya çapında kansere bağlı ölümlerin dördüncü en yaygın nedeni olup, 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %9'dur. Hastaların risk gruplarına ayrılması ve tedavi planlarının oluşturulması için tümör evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Güncel tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) evreleme sistemi, yeterince güçlü bir prognostik değer sunmamaktadır⁸². Bu sebeple pankreas kanserlerini moleküler olarak sınıflandırmanın yararlı prognostik veriler sağlayarak tedavi ve sağkalımı arttırmada önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, pankreas tümörlerinde görülen morfolojik heterojenite bu durumu zorlaştırmaktadır.

Tümör tomurcuklanması, karsinomların histopatolojik incelemesinde peritümöral ya da intratümöral gözlenen bir çeşit infiltratif büyüme paternini tanımlamaktadır ve sıklıkla tümörde EMT'yi yansıttığı düşünülmektedir^{83,84}. TT, kolorektal karsinom, meme kanseri, akciğer kanseri gibi diğer çeşitli adenokarsinomlarda da tanımlanmıştır. Mide, özofagus ve gastro-özofageal bileşke adenokarsinomlarında ve özofagus skuamöz hücreli karsinomlarında tümör tomurcuklanmasının varlığı daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir^{4,85,86,87,88,89,90,91}. Literatürde PDAK'ta yüksek tomurcuklanmanın kısa sağ kalımla ilişkisi gösterilmiş ve bağımsız prognostik faktör olarak bildirilmiştir^{92,93}.

Serimizde pankreas kanserlerinde, TT peritümöral ve intratümöral alanda ayrı olarak değerlendirilmiştir. TT'de 3'lü derecelendirme sistemi kullanılmış, istatistiksel değerlendirmede gruplar stratifiye edilmiştir (1 BBA'da: beş altı ve üstü: grup 1, dokuz altı ve üstü, grup 2 olacak şekilde) İntratümöral >5/1BBA düzeyde tomurcuklanma içeren olgularda ve peritümöral >9 /1BBA tomurcuklanma gösteren tümörlerin kısa sağ kalım süreleriyle ilişkili oldukları saptanmıştır ($p<0.001$). Bu bulgu literatürü desteklemektedir. Sağ kalım ile anlamlı ilişkisi bulunan diğer morfolojik parametreler ise MF, TBHG ve nekroz varlığıdır ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$).

Literatüre baktığımızda EMT süreci ile ilişkili belirteçler, moleküler yolaklar ve klinik prognostik veriler ile ilgili birçok çalışma vardır^{75,46,24}. Bildiğimiz kadarıyla EMT'yi temsil edebilecek morfolojik bulgular üzerine yeterince çalışma bulunmamaktadır. EMT'nin bilinen en önemli morfolojik göstergesi TT'dir. Çalışmamızın sonuçlarına göre,

TT'ye eşlik edebilecek diğer morfolojik bulgulardan MF, TBHG ve nekroz, İTT ve PTT varlığı ile de istatistiksel olarak anlamlı birliktelik göstermiştir. Stroma miktarı İTT'si (>9/1BBA) olgularda daha az görülmüştür ($p=0.030$). İnkomplet bez varlığı, tomurcuklanması 5/1BBA 'in üzerinde olan olgularda daha fazla izlenmektedir ($p=0.030$). ÇADM ise 9 üzeri tomurcuklanması olan olgularda yüksek oranda bulunmuştur ($p<0.001$).

İnvaziv duktal meme karsinomlarında yüksek TT'nin kısa sağkalım süreleriyle ilişkisi gösterilmiştir ancak TT nekroz ile anlamlı bulunmamıştır⁸⁵. Çalışmamızda TT'si 5'in üzerinde olan olgularda nekroz, MF (frontback-polarity) ve TBHG daha yüksek oranda görülmüş ve her parametrenin istatistiksel olarak sağkalımla ilişkisi bulunmuştur. EMT'de epitelyal hücrelerin apikal-bazal polaritesini yitirdiği, hücre iskeletini değiştirdiği ve hücreler arası yapışma özelliklerinin azaldığı, hücre fenotiplerde çok yönlü ve sıklıkla geri dönüşebilen kompleks değişiklikler meydana geldiği belirtilmektedir. Bu EMT mekanizmalarını hücresel düzeyde ve morfolojik bulgularla açıklamak oldukça karışıktır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, serimizde izlenen tomurcuklanma ve sağ kalım ile ilişkili olduğu saptanan bu 3 morfolojik bulgu (MF, TBHG, Nekroz) birlikte değerlendirildiğinde, tümörlerde EMT'nin ön görülebileceği ve bu bulguların prognozu yansıtabilecekleri öne sürülmektedir. Yüksek TT görülen tümörlerde diferansiasyon kaybının daha fazla olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda bahsedilen 3 morfolojik parametrenin varlığı (MF, TBHG, Nekroz) ile tümörlerin az diferansiye olması arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmış olup, bu bulgu, iddiamızı önemli ölçüde desteklemektedir ($p<0.001$, $p=0.007$, $p=0.042$). Bu parametreler ve belirgin e-kadherin kaybı ile oluşturulan çok değişkenli lojistik regresyon analizinde; mortalite ve nüks açısından istatistiksel anlamlılık görülmemiş ancak nekroz varlığı tek başına hem genel sağkalım hem de hastalık sağ kalım açısından bağımsız negatif prognostik faktör olarak saptanmıştır ($p=0.023$, $p=0.015$).

Bahsedilen 3 morfolojik parametrenin (MF, TBHG, Nekroz) diğer prognostik veriler ile ilişkisine bakıldığında; kısa hastalıksız sağ kalım süreleri ile, nekroz (log rank $p=0.012$) ve MP (log rank $p=0.002$) ilişkili bulunmuştur. Tümör tomurcuklanması ise anlamlı değerin hemen üstünde kalmıştır ($p=0.056$). TBHG ile hastalıksız sağ kalım arasında ilişki görülmemiştir. MF varlığı ile kısa sağkalım süreleri, yüksek tomurcuklanma düzeyi ve az diferansiasyon dışında, tümörlerde LVİ görülmesi ile de anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0.048$). MF sonucu uzun işi morfolojik görünümün EMT

sürecindeki hücrelerde izlenebileceğinden literatürde bahsedilmektedir⁶². Yine bu morfolojik görünümün vimentin ekspresyonu kazanılmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir⁹⁴. Çalışmada MF ile vimentin ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlılık olmamakla birlikte MF görülen olgularda daha fazla vimentin pozitifliği izlenmiştir. MF'nin tomurcuklanan hücrelerde izlenen bir görünüm olması nedeni ile tomurcuklanma ile benzer sonuçlar çıkma ihtimali bias olasılığını düşündürmektedir.

TT ile LVİ arasında istatistiksel anlam saptanmamışken MF ile artmış LVİ istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre MF, TT'dan bağımsız olarak prognozu belirlemede yüksek potansiyeli olan bir bulgudur. Serimizde literatürde ilk kez bakılan TBHG istatistiksel anlamlılık olmaksızın nüks görülen olgularda daha fazla görülmüştür. Kısa sağ kalım, diferansiasyon kaybı ve TT ile ilişkili olduğu bilinen bu parametrenin tomurcuklanmanın daha az görüldüğü tümörlerde prognostik açıdan yardımcı bir bulgu olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

EMT ve TT metastaz gelişmesinde önemli bir adım olarak bilinmektedir⁹². Lenf nodu metastazı, LVİ, PNİ ve evre ile TT arasında istatistiksel anlam saptanmamıştır. İstatistiksel anlam olmamakla birlikte nüks gözlenen hastalarda tümör tomurcuklanması (%72.3'e karşı %54.5), MP (%55.3'e karşı %27.3) ve TBHG daha fazla oranda görülmüştür. Nüks artışı ile uyumlu bu morfolojik parametreler tümör hücrelerindeki EMT değişikliklerinin tümör nüksünü de arttırabileceğini düşündürmüştür.

EMT'de mezenkimal bir hücre oluşturmak için hücre-hücre yapışması ve apikal-bazal polarite gibi epitelyal özellikler ilerleyici ve geri dönüşümlü olarak kayba uğramaktadır ve apikal-bazal hücre polarite kaybı da bu mekanizmanın morfolojik görünümülerinden biridir.⁹⁵ Serimizde sağ kalım ve nüks ile ABHPK arasında istatistiksel anlam bulunmamıştır. İleri evre ve LVİ olan olgularda ABHPK daha sık görülmüştür. ABHPK, tomurcuklanma dahil diğer morfolojik parametrelerle ilişkisi görülmemiştir. Çalışmamızda çoğu tümörde fokal de olsa polarite kaybı izlenmiş ve değerlendirmeye alınmıştır. Ancak çıkan sonuçlara bakıldığında EMT'nin ilk aşaması olarak düşünülebilecek ve diğer morfolojilerle paralellik göstermesi beklenen ABHPK'nın morfolojik yansımasının ve değerlendirme kriterlerinin daha ayrıntılı tanımlanması gerektiği düşünülebilir.

EMT sürecindeki hücrelerinin bir kısmı invaziv tümör oluşumundan sonra duktal yapılardan ayrılır ve bitişik stromayı istila eder⁶⁷. Bu sürecin morfolojik yansıması, stromada tek veya gruplar halinde tümör hücreleri yanı sıra çevrede inkomplet bez yapılarının görülmesi olabilir. Bu düşünce doğrultusunda inkomplet bezlerin varlığı epitelyal ve mezenkimal fenotipler arasındaki ara geçişi tarifleyen bir morfolojik görünüm olarak ele alınmıştır. Bu morfolojik parametre ile sadece PTT arasında istatistiksel anlam saptanmış olup 5'in üzerinde tomurcuklanan tümörlerde daha fazla görülmüştür ($p=0.030$). Buna ek olarak, serimizde, istatistiksel anlam olmaksızın düşük sağ kalım, nüks eden hastalık, LVI, PVI varlığı ve ileri evre olgularda inkomplet bez yapıları daha çok görülen bir bulgudur. Saptadığımız bu veri, inkomplet bezlerin EMT ve prognozla ilişkisini aydınlayabilecek daha ileri çalışmalara önemli bilgiler sunmaktadır.

Pankreas kanserlerindeki bez yapıları, tümörün büyük bir kısmını oluşturan stroma ile çevrelenir. Stroma tümörün ilerlemesi ve ilaç tedavisi için kritik bir faktör olarak kabul edilmektedir⁹⁶. Son çalışmalar ayrıca tümör hücresi çeşitliliğinin anlaşılmasında stromal bileşenin yanı sıra bu etkileşimlerin tümör yapısını ve hasta prognozunu nasıl şekillendirdiğini vurgulamaktadır⁹⁷. Bu prensibe göre, tümör içi stroma miktarının da hasta prognozuyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir⁹⁸. Artmış ekstrasellüler matriks (ECM) ve fibrozis, doku vaskülarizasyonu baskılayarak hipoksiye neden olmakta ve bu durum KİF'lerin uyarılarak EMT'ye, tümörün artmış invazyon yeteneğine, anjiyogeneze ve metastaza katkıda bulunmaktadır^{43,44,45,46}. Artmış stromanın bu ve immun özellikleri nedeniyle anti-fibrotik tedavi yöntemleri üzerinde hala çalışılmaktadır⁴⁷. Ancak desmoplastik stromayı hedef alan bazı klinik çalışmalarda sonuçlar alınamamakta ve fare modellerinde bir takım desmoplastik stroma miktarını azaltmaya yönelik tedavi stratejilerinin daha agresif tümörlere yol açtığı görülmektedir^{48,49}. Tümör stroma miktarının fazla olmasının mortaliteyi düşürdüğü ve koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmektedir⁵⁰. PDAK'taki mikroortam oldukça heterojendir ve stromanın bu kompleks yapısının tümörün agresifliğindeki rolü tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Serimizde stroma miktarı ile tomurcuklanma arasında ile istatistiksel anlamlı ilişkili görülmüştür. İTT'si >9/1BBA olan tümörlerde stroma miktarının daha az olduğu saptanmıştır ($p=0.030$). Ek olarak, az diferansiye tümörlerde stroma miktarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az olduğu saptanmıştır ($p=0.003$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte birlikte kısa sağ kalım süresi,

nüks, LVİ ve ileri evre olan olgularda stroma miktarı az olarak görülmüştür. Bu nedenle stroma miktarı ile ilgili daha geniş serilerde yapılacak çalışmalar literatürü daha destekleyici olabilir.

Stromanın önemli bir bileşeni olan immun hücrelerin varlığı ve tümör mikro ortamı (TMO), hastanın prognozunu ve immünoterapiye olan yanıtını etkilediği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda yüksek seviyede lenfositik infiltrasyon, immünoterapiye daha iyi yanıtla ilişkilendirilmiştir^{99,100}. Kronik inflamasyon ile kanser ilerlemesi ve metastazını ilişkilendirilen literatürde çok sayıda çalışma vardır^{101,102,103,104}. EMT ilişkili kanser hücreleri ile kronik inflamasyon arasındaki ittifakın veya karşılıklı etkileşimin, metastazı desteklediği düşünülmektedir¹⁰¹. Bununla birlikte EMT görülen tümörlerde inflamatuvar hücrelerin, EMT'yi tetiklediği ve tümörün invazyon özelliğini arttırdığı da bilinmektedir. Enflamasyonla ilişkilendirilen EMT, kanserin ilerlemesinin daha ileri aşamalarıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada inflamatuvar meme kanseri olan hastalarda, immün aktivasyon ile EMT özelliklerine sahip dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'ler) varlığı arasında korelasyon bulunmuştur¹⁰¹. Başka bir çalışmada ise mide-özofagus kanserlerinde yüksek tümör tomurcuklanması ve düşük inflamatuvar yanıtın kötü prognozla ilişkili olduğu görülmektedir¹⁰⁵. Literatürde PDAK'larda yüksek düzeyde tümör tomurcuklanması gösteren tümörlerde immunsupresif mikroortam görülmekte ve bu durum negatif prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak EMT ilişkili tümör hücreleri ve immun mikroortam arasındaki etkileşim dinamik bir süreçtir ve pankreas kanserilerindeki immünolojik heterojenliği anlamak ve immunoterapi sonuçlarını iyileştirmek için EMT'yi hedef almak gerekmektedir¹⁰⁶.

Çalışmamızda ise tümör ilişkili lenfositik infiltrat ile çalışılan parametreler arasında tek istatistiksel anlamlı ilişki vimentin ekspresyonunda görülmüş olup vimentin pozitif olgularda TÇLİ daha düşük oranda izlenmiştir ($p=0.036$). Serimizde TİLİ ve TÇLİ ile tümör tomurcuklanması arasında anlamlı ilişki görülmemiştir. Bu bulgular EMT ile tümör immunsupresif mikroortam ilişkisini gösterebilecek yeterlilikte değildir. Yine sağkalım ve nüks ile istatistiksel anlamlı olmaksızın TİLİ uzun sağ kalım ve nüksüz gruplarda daha fazla görülmüştür. LVİ'si olmayan olgularda TİLİ daha fazla iken PNI'si olmayan ve düşük evreli olgularda ise daha az olarak bulunmuştur. TÇLİ ile diferansiasyon arasında istatistiksel anlam olmamakla birlikte anlamlı değere yakın saptanmıştır. İyi diferansiye tümörlerde TÇLİ daha fazla görülmüştür ($p=0.078$).

Diferansiasyonu iyi, uzun sağ kalım, nüksüz izlemi olan, LVİ ve PNI'si olmayan olgularda TÇLİ daha yüksek oranda izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiş olmasına rağmen, bulgularımız TÇLİ'nin iyi prognozla ilişkili olabileceğini ve yüksek dereceli tümörlerde immunsupresif mikroçevrenin varlığını işaret etmektedir ancak kesin olarak kanıtlanamamaktadır. Bu nedenle, bu konuda daha geniş serilerde çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Pankreatik duktal adenokarsinomun (PDAK) gelişimi, birden fazla genetik mutasyonun ilerleyici birikimi ile yönlendirilir. Bu mutasyonlar arasında en önemlileri, onkogen KRAS ile tümör baskılayıcı genler p53, CDKN2A ve SMAD4'tür. Bu tür genetik değişiklikler EMT süreçlerinde de görülmekte ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, inflamatuvar mikroortam, tümör ilerlemesinin farklı aşamalarını temsil eden spesifik morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Vakaların çoğunda, bu moleküler değişikliklerin ilk adımının, asiner/sentroasiner hücrelerin kanal benzeri hücrelere dönüştüğü asiner-duktal metaplazi (ADM) süreci olduğuna inanılmaktadır^{107,108,109}. PDAK'ın prekürsör lezyonlarında, EMT'nin etkinleşmesi, inflamatuvar ortamın etkisiyle başlar. Asiner-duktal metaplazi alanlarında bir dizi hücre EMT'ye tabi tutulur ve invaziv tümör oluşumunda bu hücreler duktus yapılarından ayrılıp komşu stromayı istila etmektedir⁶⁷. Özetle ADM'de inflamatuvar mikroçevre tarafından tetiklenen EMT aktivasyonu, kanser hücrelerinin erken invazyon ve yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Serimizde ÇADM, tümörün invazyon ve yayılımını destekleyen yüksek tomurcuklanma ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. PTT'si >9/1BBA 'nın üzerinde olan olgularda ÇADM bulunma oranı %78.4 iken, 9 altı olanlarda %57.1 olarak izlenmiştir (p=0.032). Genel sağkalım ile ÇADM arasında yapılan istatistiksel analizde log rank değeri anlamlı eşğin hemen üstünde kalmıştır (log rank, p=0.056). Kısa sağ kalım görülen hastalarda ÇADM varlığı daha fazla izlenmiştir. Bununla birlikte ileri evrelerde, LVİ olan olgularda ve LOXL2 epitel boyanmanın olduğu olgularda ÇADM daha çok görülmüştür. Literatür bilgisi eşliğinde; bu bulgular, ÇADM'nin EMT ile ilişkisini desteklemekte ve potansiyel prognostik önemine dikkat çekmektedir.

E-kadherin, vimentin, keratin EMT hücre özellikleri gösteren belirteçlerdir⁶⁵. EMT ilişkili kanser hücreleri mezenkimal belirteçleri kazanırken epitelyal belirteçleri kısmen kaybetmektedir. Meme tümörlerinde epitel hücrelerinin vimentin ekspresyonu kazanması, hastaların ameliyat sonrası hayatta kalma oranlarını düşürmüş ve keratin/vimentin ekspresyon oranının, tek başına vimentin ekspresyonuna göre daha

kötü prognozlu olduğunu göstermiştir⁶⁹. E-kaderin kaybı, hem in vivo hem de akciğer, meme, kolorektal ve over kanseri dahil olmak üzere kanser hücre dizilerinde EMT'nin önemli bir bulgusu olarak tanımlanmaktadır^{70,71,72}. Hücre-hücre adezyonu kaybına sebep olan aşağı regülasyonu, hücrelerin tek tek ana tümör kitlesinden ayrılmasında ve karsinomun ilerlemesinde önemli bir özelliği temsil etmektedir. E-Cadherin kaybı sıklıkla tümör hücrelerinin diferansiyasyon kaybı, invazyon yetenekleri ve erken dönemde metastaz görülmesi ile yakından ilişkilidir. E-Cadherin kaybı, çeşitli çalışmalarda tanımlanmış olup, pankreas ve diğer kanserlerde aşağı regülasyonunun kötü sonuçlarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür⁷³.

Çalışmamızda EMT ilişkili morfolojik bulgular ile E-Cadherin kaybının ilişkisi değerlendirildiğinde; tomurcuklanma ile istatistiksel anlamlı ilişki görülmemiştir. Bununla birlikte E-Cadherin kaybı görülen olgularda nekroz daha fazla izlenmiştir($p=0.007$). Diğer morfolojik parametrelerle de istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Kısa sağ kalım olan hastalarda ise E-Cadherin kaybı istatistiksel anlamlı düzeyde daha fazla görülmüştür (log rank, $p<0,001$).

Tümörde vimentin pozitifliği ile E-Cadherin boyanması arasında anlamlı ilişki bulunmamış olup vimentin pozitifliği düşük evre tümörlerde fazla görülmüştür ($p=0.027$). Vimentin ekspresyonun tomurcuklanma ve sağ kalım ile ilişkisi görülmemiştir. Bu iki belirleyicinin ekspresyonları (E-Cadherin kaybı ve vimentin pozitifliği) ileri evre lenf nodu metastazı, ileri tümör evresi, az diferansiyasyon, LVİ ve PNI varlığı ile pozitif ilişkilidir. Keratin ise tüm olgularda pozitif izlenmiş olup ekspresyon kaybı izlenmemiştir. EMT ilişkili tümörlerin vimentin-keratin birlikte eksprese ettiğini düşündüğümüzde serimizdeki tomurcuklanan hücrelerdeki keratin pozitifliği, vimentin pozitif tümörlerde epitelyal özelliklerin de devam ettiğini düşündürmüştür. Bununla birlikte keratin ekspresyonu ile EMT sürecini yansıtacak daha ileri bir yorum sağlamamıştır. Çalışmamızın sonuçları E-Cadherin kaybının sağ kalımı negatif yönde etkilediğini ve EMT ilişkili morfolojik bulgulardan olabilecek nekroz ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Literatürle uyumlu olarak PDAK'da E-cadherin kaybı ve Vimentin ekspresyonu kötü prognozu yansıtabilecek belirteçlerdir ancak olgu sayısının daha fazla olduğu çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Lizil oksidaz (LOX) enzim ailesinin bazı kanserlerde tümör ilerlemesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çeşitli araştırmalar, LOX ve LOXL enzimlerinin, tümör hücresi istilasını ve metastazı kolaylaştıran ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden

yapılanmasını teşvik ettiğini göstermektedir. Özellikle agresif kanser türlerinde LOX ve LOXL2'nin artmış düzeyleri tespit edilmiştir ve bu durum, hastaların sağkalım oranlarının düşmesiyle ilişkilendirilmiştir¹¹⁰ Pek çok çalışmada LOXL2'nin, hücre adezyonunu sağlayan E-cadherin ekspresyonunu azalttığı ve çeşitli kanserlerde EMT'yi desteklediği gösterilmiştir. Bu mekanizmalar nedeniyle LOXL2'nin EMT'nin güçlü bir düzenleyicisi olduğu ⁷, pankreas kanserlerinde tümörün invaziv paternini belirleyen⁶ önemli bir prognostik faktör olabileceği öne sürülmektedir ⁸. Literatürde, LOXL2'nin normal pankreas dokularıyla karşılaştırıldığında pankreas kanserinde en yüksek oranda ve spesifik olarak yukarı regüle edilen genlerden biri olduğu ve pankreas kanserli hastalarda metastatik hastalık ve ölüm için bağımsız bir belirteç olduğu gösterilmiştir⁶.

LOXL2'nin hem epitelyal hem de stromal ekspresyonu literatürde bildirilmektedir. Hipoksi, özellikle ESM sertliğini artırarak tümör stromasının yeniden şekillenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, hipoksi kanserin ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilendirilir^{111,112}. LOXL2, hipoksi tarafından düzenlenir ve LOXL2'nin stromal ekspresyonu matriksin yeniden modellenmesini sağlar. Literatürde bu özelliği ile hepatoselüler karsinom ve kolanjisellüler karsinomlarda metastaz ile bağlantılı bir matriks yeniden düzenleme enzimi olarak bahsedilmektedir^{76,113}. Başka bir çalışmada ise, PDAK'ın ilerlemesinde stromal içeriğin etkisini değerlendirmek için LOXL2'yi hedef alan bir antikor kullanılmıştır. Bu antikor, tip I kollajenin çapraz bağlanmasını engelleyerek tümör stromasındaki kollajen miktarını azaltmış ve dokudaki fibrozisi hafifletmiştir. Primer tümörde LOXL2 inhibisyonu ile sağlanan bu stromal değişiklik karaciğer metastazı ve genel sağkalım ile güçlü bir negatif korelasyon göstermiştir¹¹⁴. Bir diğer çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde LOXL2'nin susturulması, gemsitabin tedavisine karşı duyarlılığı arttırmış, canlı tümör hücrelerinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur¹¹⁵.

Bizim serimizde ise LOXL2 epitelyal ve stromal pozitifliği, genel sağ kalım, hastalıksız sağ kalım ve nüks ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olarak izlenmemiştir. Tomurcuklanma ve diğer morfolojik parametrelerle ilişkisi yoktur. LOXL2'ye dair istatistiksel anlamlı görülen tek bulgumuz: düşük evreli tümörlerde (pT1-pT2), LOXL2 stromal boyanması daha yüksek oranda bulunmuştur (p=0.009). Bununla birlikte istatistiksel anlam olmaksızın uzun sağ kalımı olan, LVİ ve PNI'si olmayan olgularda daha fazla LOXL2 stromal boyanması gözlenmiştir. Nüks eden hastalıkta da stromal

boyanma daha fazladır. Jiang ve arkadaşlarının çalışmasında LOXL2 inhibisyonunun tümör metastazını arttırdığı görülmüştür¹¹⁴. Bizim çalışmamızda ise LOXL2'nin stromal pozitifliğinin artışı ESM'yi yeniden şekillendirerek tümör istilasını (LVİ ve PNI olmaması ve düşük evre) negatif yönde etkileyebileceği düşündürmüştür. Jiang ve arkadaşlarının çalışması bu hipotezi destekler niteliktedir. Bununla birlikte LOXL2'ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu birçok çalışmada öne sürülmektedir. Serimiz literatürü bu yönden desteklememektedir. Ayrıca LOXL2'nin E-Cadherin kaybına sebep olduğu ve EMT'yi desteklediği bilinmektedir^{8,116,117}. LOXL2'nin artmış epitelyal ekspresyonu, EMT ilişkili olarak düşündüğümüz parametrelerden; İTT/PTT, MF, TBGH ve nekroz olan olgularda daha fazla oranda izlenmiştir. İstatiksel anlam olmaksızın mezenkimal belirleyicilerden olan vimentin ekspresyonu ve E-Cadherin kaybı izlenen olgularda, LOXL2 epitelyal boyanması daha fazla bulunmuştur (p=0.390, p=0.106). Bu açılardan LOXL2 ekspresyon artışı ile EMT ilişkili düşündüğümüz parametreler arasında yüksek korelasyon görülmüştür ancak istatiksel anlam elde edilememiştir. Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında nüks bilgisine sahip hasta sayımızın az olması yer almaktadır. Çalışmamızdaki olguların çoğunda LOXL2'nin fokal alanlarda zayıf boyanması gerçek prognostik etkisini değerlendirmeyi güçleştirmektedir.

Epitel ve mezenkimal transkripsiyon süreçlerini kontrol eden önemli transkripsiyon faktörlerinden biri de GATA6'dır. Hem doğrudan hem de dolaylı bir mekanizma ile pankreas kanseri hücrelerinde EMT'yi önleyen tümör baskılayıcı özelliği olduğu bilinmektedir²⁴. Çalışmamızda yapılan in silico analizlerde, GATA6 kopya sayısı değişiklikleri ile anlamlı ilişkili EMT yolaklarında görevli 4 gen (ROCK1, RALBP1, LINC00668, GRB2) bulunmuştur. Bu bilgi literatürde yer alan GATA6'nın EMT yolları ile ilişkisini desteklemektedir. GATA6 değişikliği görülen PDAK'larda 18q alterasyonu görülmektedir. Ayrıca GATA6 mutasyonu olan grupta FEG'lerin, daha çok hücreler arası bağlantı, adezyon, epitelyal hücrelerin farklılaşması ve kolorektal kanserlerde EMT süreçlerini gösteren yollar ile ilişkili olduğu dikkati çekmiştir. Farklı ekspresyonu olan FEG'ler içerisinde Log2 oranı 1'in üstünde olanlar, GATA6 alterasyonlarıyla ilişkili olarak daha yüksek oranda eksprese edilen gruptur. Bu nedenle bu FEG'ler, fonksiyonları en değerli grup olarak düşünülmüştür. Baktığımızda; Log2 oranı 1'in üstünde olan FEG'ler daha çok pankreas kanserinin moleküler alt tiplendirmesi (klasik ve bazal tip) ve epitel özelliklerin korunması ile bağlantılı bulunmuştur. Bulgularımız,

GATA6'nın EMT'yi düzenlemedeki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecek gelecekteki çalışmalara yardımcı bilgiler sunmaktadır. Bahsedilen 4 gen ve GATA6 ilişkili artmış FEG'lerin daha ayrıntılı araştırılması; EMT yolaklarının aydınlatılmasına, GATA6'nın PDAK'ın moleküler sınıflandırmasındaki fonksiyonuna ve EMT üzerinden geliştirilebilecek hedef tedavi yöntemlerine ışık tutacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ

1. PDAK hastalarımızda ortalama sağkalım süresi 35,7 aydır.
2. Tümör tomurcuklanması, tümörün sadece periferinde değil, tüm alanlarında görölen bir bulgudur.
3. Tümör tomurcuklanması (İTT, PTT), TBHG, MF ve nekroz varlığı, kısa sağ kalım ve kötü diferansiasyon ile ilişkilidir. Ayrıca TT fazla olan olgularda TBHG, MP ve nekroz varlığı artmıştır.
4. Tümör tomurcuklanması (TT), TBHG, MF ve nekroz birlikte değerlendirildiğinde prognostik anlamı olan EMT ilişkili morfolojik bulgulardır.
5. Serimizde literatürde ilk kez bakılan tomurcuklanmadan büyük hücre grupları (TBHG) tomurcuklanmanın yaygın olmadığı tümörlerde kötü prognoz açısından yardımcı bir bulgu olarak kullanılabilir.
6. MF varlığı ile lenfovasküler invazyon ilişkilidir.
7. Nekroz hem genel sağ kalım hem de hastalıksız sağ kalım açısından negatif bağımsız prognostik faktördür.
8. Çalışmamızdaki BHPK ile anlamlı sonuç saptanmaması, bu morfolojik görünümün tekrar gözden geçirilmesini ve ileriki çalışmalar için geliştirilmiş tanımlama kriterleri belirlenmesi gerektiğini düşündürmüştür.
9. İnkomplet bez varlığı tomurcuklanma ile ilişkilidir. Çalışmamız EMT ve prognozla ilişkisini aydınlayabilecek daha ileri çalışmalara önemli bilgiler sunmaktadır.
10. Stroma miktarı tomurcuklanan ve az diferansiye tümörlerde daha az görölmüştür.
11. Tümör içi ve çevresi lenfosittik infiltrat TT ve sağ kalımla ilişkili bulunmamıştır.

12. Çevre asiner duktal metaplazi (ÇADM), TT ile ilişkilidir. EMT ilişkili bir bulgu olarak görülmekte ve potansiyel prognostik öneme sahip olabileceği düşünülmektedir.
13. E-Cadherin kaybı, nekroz varlığı ve kısa sağ kalımla ilişkilidir.
14. Vimentin pozitifliği tomurcuklanma ve sağ kalımla anlamlı ilişki göstermemektedir.
15. Literatürle uyumlu olarak PDAK'da E-Cadherin kaybı ve Vimentin ekspresyonu kötü prognozu yansıtabilecek belirteçlerdir ancak olgu sayısının daha fazla olduğu çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.
16. LOXL2 epitelyal ve stromal pozitifliği, genel sağ kalım, hastalıksız sağ kalım ve nüks ile ilişkili değildir.
17. LOXL2 stromal pozitifliği düşük evre tümörlerde daha çok görülmektedir.
18. LOXL2 ekspresyon artışı ile EMT ilişkili düşündüğümüz parametreler arasında yüksek korelasyon vardır ancak istatistiksel anlam elde edilememiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Zhang, B. *et al.* The LIM protein Ajuba/SP1 complex forms a feed forward loop to induce SP1 target genes and promote pancreatic cancer cell proliferation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 1–11 (2019).
2. Wang, S., Huang, S. & Sun, Y. L. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: A review. *Biomed Res. Int.* **2017**, (2017).
3. Karamitopoulou, E. Role of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: Is tumor budding the missing link? *Front. Oncol.* **3 SEP**, 1–5 (2013).
4. Zlobec, I. & Lugli, A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* **1**, 651–661 (2010).
5. Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 151–166 (2009).
6. Park, J. S. *et al.* Emerging role of LOXL2 in the promotion of pancreas cancer metastasis. *Oncotarget* **7**, 42539–42552 (2016).
7. Cano, A., Santamaría, P. G. & Moreno-Bueno, G. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Futur. Oncol.* **8**, 1095–1108 (2012).
8. Tanaka, N. *et al.* Clinical Implications of Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Expression in Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).
9. Kasashima, H. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Lett.* **354**, 438–446 (2014).
10. Barker, H. E., Cox, T. R. & Erler, J. T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 540–552 (2012).
11. Molkenstein, J. D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6: Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 38949–38952 (2000).
12. Maeda, M., Ohashi, K. & Ohashi-Kobayashi, A. Further extension of

- mammalian GATA-6. *Dev. Growth Differ.* **47**, 591–600 (2005).
13. Maeda, M., Kubo, K., Nishi, T. & Futai, M. Roles of gastric GATA DNA-binding proteins. *J. Exp. Biol.* **199**, 513–520 (1996).
 14. Zhao, R. *et al.* Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 15. Deckera, K., Goldmanb, D. C., Grashb, C. L. & Sussela, L. Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 16. Kiiveri, S. *et al.* Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. *Mol. Med.* **5**, 490–501 (1999).
 17. Haveri, H. *et al.* Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol.* **8**, (2008).
 18. Kamnasaran, D., Qian, B., Hawkins, C., Stanford, W. L. & Guha, A. GATA6 is an astrocytoma tumor suppressor gene identified by gene trapping of mouse glioma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8053–8058 (2007).
 19. Guo, M. *et al.* Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7917–7924 (2004).
 20. Kwei, K. A. *et al.* Genomic profiling identifies GATA6 as a candidate oncogene amplified in pancreaticobiliary cancer. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
 21. O’Kane, G. M. *et al.* GATA6 Expression Distinguishes Classical and Basal-like Subtypes in Advanced Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, 4901–4910 (2020).
 22. Zhong, Y. *et al.* GATA6 activates Wnt signaling in pancreatic cancer by negatively regulating the Wnt antagonist Dickkopf-1. *PLoS One* **6**, (2011).
 23. Fu, B., Luo, M., Lakkur, S., Lucito, R. & Iacobuzio-Donahue, C. A. Frequent genomic copy number gain and overexpression of GATA-6 in pancreatic carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1593–1601 (2008).
 24. Martinelli, P. *et al.* GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut* **66**,

- 1665–1676 (2017).
25. Peng, T. *et al.* The interaction of LOXL2 with GATA6 induces VEGFA expression and angiogenesis in cholangiocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **55**, 657–670 (2019).
 26. Merino, P. L. H. Developmental biology of the pancreas. *Cell Biochem. Biophys.* **40**, 127–142 (2004).
 27. Talathi, S. S., Zimmerman, R. & Young, M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas - StatPearls - NCBI Bookshelf. *National Center of Biotechnology Information* (2020).
 28. Ross, M. H., & Pawlina, W. *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology (6th ed.)*. Philadelphia: Lip pincott Williams & Wilkins. (2010).
 29. Luiz Carlos Junqueira, B. & Carneiro, J. Basic Histology 10th edition. *J. Anat* **211**, 412–413 (2007).
 30. Love, J. A., Yi, E. & Smith, T. G. Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **133**, 19–34 (2007).
 31. From, R., Baltimore, T. H. E., For, M., Precursor, N. & In, L. Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the. **39**, 1730–1741 (2016).
 32. Tanaka, M. *et al.* Revisions of international consensus Fukuoka guidelines for the management of IPMN of the pancreas. *Pancreatology* **17**, 738–753 (2017).
 33. Basturk, O. *et al.* Intraductal Tubulopapillary Neoplasm of the Pancreas: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Analysis of 33 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **41**, 313–325 (2017).
 34. Jang, K. T. *et al.* Clinicopathologic characteristics of 29 invasive carcinomas arising in 178 pancreatic mucinous cystic neoplasms with ovarian-type stroma: Implications for management and prognosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 179–187 (2015).
 35. Rahib, L. *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res.* **74**, 2913–2921 (2014).

36. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
37. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 5–29 (2015).
38. DeSantis, C. E. *et al.* Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 290–308 (2016).
39. Ushio, J. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Diagnostics* **11**, 1–13 (2021).
40. Nagtegaal, I. D. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* **76**, 182–188 (2020).
41. Thomas A. Mace¹, Zeenath Ameen¹, A. C. Pancreatic Cancer-Associated Stellate Cells Promote Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells in a STAT3- Dependent Manner. *Bone* **23**, 1–7 (2012).
42. Shan, T. *et al.* Cancer-Associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism. *Oncol. Rep.* **37**, 1971–1979 (2017).
43. Karagiannis, G. S. *et al.* Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol. Cancer Res.* **10**, 1403–1418 (2012).
44. Von Ahrens, D., Bhagat, T. D., Nagrath, D., Maitra, A. & Verma, A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 1–8 (2017).
45. Togo, S., Polanska, U. M., Horimoto, Y. & Orimo, A. Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)*. **5**, 149–169 (2013).
46. De Wever, O. *et al.* Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 481–494 (2008).

47. Murakami, T. *et al.* Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **3**, 130–137 (2019).
48. Lee, J. J. *et al.* Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
49. Catenacci, D. V. T. *et al.* Randomized phase Ib/II study of gemcitabine plus placebo or vismodegib, a hedgehog pathway inhibitor, in patients with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 4284–4292 (2015).
50. Torphy, R. J. *et al.* Stromal Content Is Correlated With Tissue Site, Contrast Retention, and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma. *JCO Precis. Oncol.* 1–12 (2018) doi:10.1200/po.17.00121.
51. Haeberle, L. & Esposito, I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 1–12 (2019).
52. Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, M. J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* 11 ed. (Elsevier, 2018).
53. Bassi, C., Mucelli, R. P. & Megibow, A. J. *Imaging and Pathology of Pancreatic Neoplasms. Imaging and Pathology of Pancreatic Neoplasms* (2015). doi:10.1007/978-88-470-5678-7.
54. Luchini, C., Capelli, P. & Scarpa, A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surgical Pathology Clinics* vol. 9 547–560 (2016).
55. Voutsadakis, I. A. & Digkila, A. Pancreatic adenocarcinomas without KRAS, TP53, CDKN2A and SMAD4 mutations and CDKN2A/CDKN2B copy number alterations: a review of the genomic landscape to unveil therapeutic avenues. *Chinese Clin. Oncol.* **12**, 1–14 (2023).
56. Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.* **17**, 500–503 (2011).
57. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **47**, 1168–1178 (2015).
58. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic

- cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
59. Puleo, F. *et al.* Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* **155**, 1999–2013.e3 (2018).
 60. Lautizi, M. *et al.* The limits of molecular signatures for pancreatic ductal adenocarcinoma subtyping. *NAR Cancer* **4**, 1–17 (2022).
 61. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging . *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 93–99 (2017).
 62. Leggett, S. E., Hruska, A. M., Guo, M. & Wong, I. Y. The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. *Cell Commun. Signal.* **19**, 1–24 (2021).
 63. Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 587–597 (2007).
 64. Nelson, W. J. Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–20 (2009).
 65. Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 341–352 (2020).
 66. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev. Cell* **14**, 818–829 (2008).
 67. Palamaris, K., Felekouras, E. & Sakellariou, S. Epithelial to mesenchymal transition: Key regulator of pancreatic ductal adenocarcinoma progression and chemoresistance. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–23 (2021).
 68. Barrios-Rodiles, M. *et al.* High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* vol. 307 1621–1625 (2005).
 69. Thomas, P. A. *et al.* Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients.

- Clin. Cancer Res.* **5**, 2698–2703 (1999).
70. Hotz, B. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4769–4776 (2007).
 71. Celesti, G. *et al.* Presence of twist1-positive neoplastic cells in the stroma of chromosome-unstable colorectal tumors. *Gastroenterology* **145**, 647-657.e15 (2013).
 72. Raghu Kalluri, R. A. W. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6)1420-1428. **To be subm**, 1420–1428 (2009).
 73. Sommariva, M. & Gagliano, N. E-Cadherin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Multifaceted Actor during EMT. *Cells* **9**, (2020).
 74. Javle, M. M. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 3527–3533 (2007).
 75. Nakajima, S. *et al.* N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4125–4133 (2004).
 76. Bergeat, D. *et al.* Impact of stroma LOXL2 overexpression on the prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Surgical Research* vol. 203 441–450 (2016).
 77. Duan, K. *et al.* The value of GATA6 immunohistochemistry and computer-assisted diagnosis to predict clinical outcome in advanced pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **11**, 1–9 (2021).
 78. Lugli, A. *et al.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* **30**, 1299–1311 (2017).
 79. de Bruijn, I. *et al.* Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res.* (2023) doi:10.1158/0008-5472.can-23-0816.
 80. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E. & Sumer, O. S. The CBio

- Cancer Genomics. *Cancer Discov.* **2**, 1–7 (2012).
81. Gao, J. *et al.* Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal Complementary Data Sources and Analysis Options. *Sci. Signal.* **6**, 1–20 (2013).
 82. Li, B. *et al.* Pros and Cons: High Proportion of Stromal Component Indicates Better Prognosis in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma—A Research Based on the Evaluation of Whole-Mount Histological Slides. *Front. Oncol.* **10**, 1–10 (2020).
 83. Koen, E. J. & Collier, A. B. Particle-in-cell simulations of a beam driven plasma. *Phys. Plasmas* **To be subm**, 1420–1428 (2010).
 84. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. Emt: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
 85. Gujam, F. J. A., McMillan, D. C., Mohammed, Z. M. A., Edwards, J. & Going, J. J. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* **113**, 1066–1074 (2015).
 86. Liang, F. *et al.* The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* **209**, 269–275 (2013).
 87. Kazama, S., Watanabe, T., Ajioka, Y., Kanazawa, T. & Nagawa, H. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br. J. Cancer* **94**, 293–298 (2006).
 88. Yamaguchi, Y. *et al.* Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: Tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J. Thorac. Oncol.* **5**, 1361–1368 (2010).
 89. Tanaka, K. *et al.* Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *Br. J. Cancer* **110**, 2923–2934 (2014).
 90. Koike, M. *et al.* Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: Tumor budding is a significant independent prognostic

- factor. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 1977–1982 (2008).
91. Miyata, H. *et al.* Tumor budding in tumor invasive front predicts prognosis and survival of patients with esophageal squamous cell carcinomas receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* **115**, 3324–3334 (2009).
 92. Lohneis, P. *et al.* Tumour buds determine prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **118**, 1485–1491 (2018).
 93. Karamitopoulou, E. *et al.* Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer* **49**, 1032–1039 (2013).
 94. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H. & Goldma, R. D. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *J. Biol. Chem.* **290**, 17145–17153 (2015).
 95. Buckley, C. E. & St Johnston, D. Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 559–577 (2022).
 96. Di Maggio, F. & El-Shakankery, K. H. Desmoplasia and Biophysics in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Can We Learn from Breast Cancer? *Pancreas* **49**, 313–325 (2020).
 97. Ligorio, M. *et al.* HHS Public Access of Pancreatic Cancer. **178**, 160–175 (2020).
 98. Whatcott, C. J. *et al.* pancreatic cancer. **21**, 3561–3568 (2016).
 99. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. & Gögenur, I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer* **124**, 359–367 (2021).
 100. Takeuchi, Y. & Nishikawa, H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int. Immunol.* **28**, 401–409 (2016).
 101. Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D. & Gilles, C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol. Oncol.* **11**, 805–823 (2017).
 102. Crusz, S. M. & Balkwill, F. R. Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 584–596 (2015).
 103. R H Young 1, E Oliva, R. E. S. Small cell carcinoma of the ovary,

- hypercalcemic type. A clinicopathological analysis of 150 cases.
104. Pesic, M. & Greten, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 43 55–61 (2016).
 105. Brown, M. *et al.* Tumour budding and a low host inflammatory response are associated with a poor prognosis in oesophageal and gastro-oesophageal junction cancers. *Histopathology* **56**, 893–899 (2010).
 106. Sadozai, H., Acharjee, A., Gruber, T., Gloor, B. & Karamitopoulou, E. Pancreatic cancers with high grade tumor budding exhibit hallmarks of diminished anti-tumor immunity. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–18 (2021).
 107. Rooman, I. & Real, F. X. Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: A matter of differentiation and development? *Gut* **61**, 449–458 (2012).
 108. Storz, P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 296–304 (2017).
 109. Stanger, B. Z. *et al.* Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* **8**, 185–195 (2005).
 110. Coffelt, S. B. & Morton, J. P. LOXL2 in pancreatic tumourigenesis: The complexity of tumour-stromal crosstalk exemplified. *Gut* vol. 72 221–222 (2023).
 111. Sirica, A. E. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 44–54 (2012).
 112. Sulpice, L. *et al.* Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* **58**, 1992–2000 (2013).
 113. Wong, C. C. L. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **60**, 1645–1658 (2014).
 114. Jiang, H. *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma progression is restrained by stromal matrix. *J. Clin. Invest.* **130**, 4704–4709 (2020).
 115. Rückert, F., Joensson, P., Saeger, H. D., Grützmann, R. & Pilarsky, C.

- Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 303–311 (2010).
116. Molnar, J. *et al.* Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1647**, 220–224 (2003).
117. Schietke, R. *et al.* The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in Hypoxia: Insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J. Biol. Chem.* **285**, 6658–6669 (2010).

