



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU VE SAKKAROZ TÜKETEN
SIÇANLARDA DİMETİL BENZANTRASEN (DMBA) İLE OLUŞTURULAN
PANKREAS ADENOKARSİNOMLARINDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ
(MMP-2 VE MMP-9) AKTİVİTELERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL
YÖNTEMLE İNCELENMESİ**

Sevda İNAN

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2015



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK FRUKTOZLU MISIR ŞURUBU VE SAKKAROZ TÜKETEN SIÇANLARDA
DİMETİL BENZANTRASEN (DMBA) İLE OLUŞTURULAN PANKREAS
ADENOKARSİNOMLARINDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP-2 VE
MMP-9) AKTİVİTELERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE
İNCELENMESİ

Sevda İNAN

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ


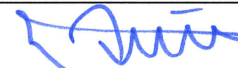
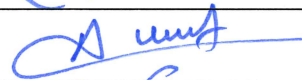

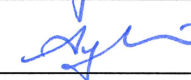
BURSA-2015



Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından HDP(V)-2014/46 numaralı hızlı destek projesi ile desteklenmiştir.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner Patoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sevda İNAN tarafından hazırlanan Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Ve Sakkaroz Tüketen Sıçanlarda Dimetil Benzantrazen (Dmba) İle Oluşturulan Pankreas Adenokarsinomlarında Matriks Metalloproteinaz (Mmp-2 Ve Mmp-9) Aktivitelerinin İmmunohistokimyasal Yöntemle İncelenmesi" konulu Doktora tezi 07/07/2015 günü, 10:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç.Dr. Ahmet AKKOÇ	
Üye	Prof. Dr. M.Müfit KAHRAMAN	
Üye	Doç.Dr. Alper SEVİMLİ	
Üye	Doç.Dr. Funda YILDIRIM	
Üye	Yard.Doç.Dr. Aylin A. DEMİRER	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Metin PETEK

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	III
İNGİLİZCE ÖZET	IV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
GEREÇ ve YÖNTEM	18
Gereç	18
Hayvan Materyali	18
Histopatolojik Preparatların Hazırlanması	19
Mikroskopik İnceleme	19
İmmunohistokimyasal Boyamalar	19
Yöntem	21
Nekropsi	21
Histopatolojik İnceleme	21
İmmunohistokimya İşlemi	21
İmmunohistokimyasal Skorlama	23
İstatistik Değerlendirme	23
BULGULAR	24
Makroskopik Bulgular	24
Mikroskopik Bulgular	27
İmmunohistokimyasal Bulgular	31
MMP-9 Antikoru İle Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamalar	31
MMP-2 Antikoru İle Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamalar	32

İmmunohistokimyasal Skorlama Sonuçları	37
TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	48
TEŞEKKÜR	56
ÖZGEÇMİŞ	57



ÖZET

Bu tez çalışmasında, farklı beslenme modelleri (yüksek fruktozlu mısır şurubu, sakkaroz, kontrol) uygulanan Sprague Dawley ırkı sıçanlarda deneysel olarak 7,12 Dimetil Benzantrasen (DMBA) implantasyonu ile oluşturulan pankreas duktal adenokarsinomlarında (PDAK) matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) enzimlerinin immunohistokimyasal yöntemle incelenmesi amaçlandı.

DMBA uygulanan tüm sıçanların pankreaslarında yaklaşık 0.5 -2 cm ebatlarda, beyazımtırak, orta sert kıvamlı, kesit yüzü nekrotik tümöral kitlelere rastlandı. DMBA uygulanmayan hayvanların pankreaslarında herhangi bir tümöral lezyona rastlanmadı. Histopatolojik olarak DMBA uygulanan sıçanların pankreaslarındaki tümöral kitlelerin PDAK'ları ile uyumlu oldukları görüldü. DMBA uygulanmayan tüm sıçanların pankreaslarında herhangi bir mikroskobik lezyon dikkati çekmedi.

Ticari olarak temin edilen MMP-2 ve MMP-9 primer antikörleri ile immunohistokimyasal yöntemle boyanarak tüm gruplardaki pankreas dokularında, boyanan hücreler, boyanma oranları ve boyanma şiddeti yarı kantitatif olarak değerlendirildi. İncelemeler sonucunda DMBA uygulaması sonrası duktal adenokarsinom gelişen yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMŞ), sakkaroz ve kontrol grupları arasında MMP-9 enzimi açısından, asiner hücreler ($p<0,017$) ve tubuler kompleks ($p<0,021$) yapılarında istatistiksel olarak fark bulundu. Anlamlı farklılıklar bulunan grupların ikili karşılaştırılmasında YFMŞ ve kontrol grubunda asiner hücreler ve tubuler kompleks yapılarında, sakkaroz ve kontrol grubunda ise asiner hücrelerde anlamlı fark bulundu. MMP-2 enzimine bakıldığında DMBA uygulanan YFMŞ grubunda Langerhans adacıklarında, asiner hücrelerde, tümöral duktal epitellerin boyanma oranları ve şiddetlerinde, yangı hücrelerinde, desmoplazik yapı ve tubuler komplekslerde sakkaroz ve kontrol grubuna göre medyan değeri yüksek olmasına rağmen istatistiksel fark gözlenmedi.

Sonuç olarak, MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin boyanma özellikleri farklı beslenme modellerinde karşılaştırıldığında, yüksek fruktozun PDAK'ların gelişiminde rolü olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, DMBA, pankreas duktal adenokarsinom, matriks metalloproteinaz, immunohistokimya, yüksek fruktoz, sakkaroz

SUMMARY

THE IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES (MMP-2 AND MMP-9) IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA INDUCED BY DIMETHYL BENZANTHRACENE (DMBA) IN RATS CONSUMING OF HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP AND SUCROSE

The aim of this study was to investigate immunohistochemical staining characteristics of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and MMP-9 in pancreas ductal adenocarcinomas (PDAC) experimentally induced by implantation of 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in Sprague Dawley rats fed with different feeding regimes (corn syrup containing high levels of fructose, sucrose and control).

Whitish, moderately firm tumoral masses of about 0.5 cm to 2 cm developed in pancreases of all DMBA-applied rats; the cut surfaces of the masses were necrotic. Animals which were not applied DMBA did not develop any tumoral masses in their pancreases. Histopathologically tumoral masses were confirmed to be PDACs. Rats which were not applied DMBA had normal pancreases microscopically.

Stained cells, staining rates and intensities of the pancreas tissues were investigated semi-quantitatively in MMP-2 and MMP-9 stained slides. Significant differences were observed between rats which were applied high-fructose containing corn syrup and developed PDACs, and sucrose and control groups in MMP-9 enzyme staining intensities of acinar cells ($p < 0.017$) and tubular complexes ($p < 0.021$). In comparison of groups, significant differences were observed between high-fructose containing corn syrup-fed rats and control rats in staining intensities of acinar cells and tubular complexes, and between sucrose-fed rats and control rats in staining intensities of acinar cells. In comparison of MMP-2 staining rates and intensities, although the median value was higher in islets of Langerhans, acinar cells, tumoral ductal epithelium, inflammatory cells, desmoplastic structures and tubular complexes in DMBA applied high-fructose containing corn syrup-fed rats when compared with sucrose-fed rats and control rats, no statistical difference could be observed.

As a conclusion, when MMP-2 and MMP-9 staining characteristics were compared in different feeding regimes, high fructose was suggested to have a role in development of PDACs.

Keywords: Rat, DMBA, pancreas ductal adenocarcinoma, matrix metalloproteinase, immunohistochemistry, high fructose, sucrose.

GİRİŞ

Pankreas duktal adenokarsinomları (PDAK), insanlarda sık görülen kanser türleri arasındadır ve diğer kanser kaynaklı ölümler içerisinde ön sıralardadır (1-3). PDAK, gelişen ülkelerde önemli bir sağlık problemidir ve ölümcüldür (4). Pankreas kanserlerinin görülme sıklığı 60-80 yaş aralığında olan insanlardadır (3, 5). Genç yaşlarda, erkeklerde kadınlardan 3 kat oranla daha fazla görülürken, yaş ilerledikçe kadın erkek arasındaki görülme sıklığı ve oranları eşitlenir (6). PDAK'ların etiyojisi net değildir. Risk faktörleri arasında sigara kullanımı, yağdan zengin beslenme, kronik pankreatitis, kalıtsal pankreatit, diabetes mellitus mevcuttur (3, 5, 7-9). PDAK'lar yoğun dezmoplazik stroma içerisinde duktal yapı benzeri hücreler ve tubuler kompleks yapıları ile karakterizedir (7). PDAK, iyi, orta ve kötü diferensiyasyon olarak 3 ana gruba ayrılır (10). İyi diferensiyasyonlu adenokarsinomda; sınırları belirgin bez yapısı gözlenir ve silindirik veya kübik epitel ile sahip, yuvarlak veya oval uniform çekirdek ile dağınık kromatinli az sayıda nükleer pleomorfizm gösteren neoplastik hücreler mevcuttur. Orta diferensiyasyonlu ise; bezsel yapı iyi diferensiyasyonlu olana göre daha az belirgindir ve tamamlanmamış bezsel lümenler ile nükleer pleomorfizm dikkati çeker. İyi diferensiyasyona göre hücre çekirdekleri daha büyük ve düzensizdir, mitoz daha yaygındır. Kötü diferensiyasyonlu tümörlerde, solid alanlar ve belirgin infiltratif hücreler ile kötü farklılaşmış, belirgin olmayan bez yapıları gözlenir. Kötü diferensiyasyonlu tümör tipi diğerlerine göre daha az mütasyon üretir, büyük garip şekilli (bizar) nükleus ile belirgin nükleer pleomorfizm ve atipik mitoz yaygındır (10). Bez epitelinde malignite bulguları belirgin nükleer pleomorfizm, polarite kaybı, belirgin nükleolus ve mitotik aktivitedir. İnsanlarda gözlenen olguların çoğunluğunda perinöral invazyon mevcuttur. PDAK'ların bazılarında kan damarlarına invazyon görülmektedir (8).

Kötü diferensiyasyonlu pankreas tümörleri nadir gözlenir. Neoplastik bezler pankreas parankiminde, asiner hücreler ve Langerhans adacıklarının arasında dağınık halde dikkati çeker. Bu infiltrasyon ile beraber belirgin dezmoplastik bir reaksiyon mevcuttur (7). Bölgesel lenf yumrularının tutulumu metastaz açısından önemlidir (11, 12).

PDAK'ların makroskopik olarak kesit yüzü genellikle sert, sklerotik, sınırları belirgin olmayan, sarımsı veya beyazımsı renkte gözlenir. Bazı olgularda kanama ve nekroz nadir bile olsa görülebilir. Tümörün boyutları arttıkça safra ve pankreas kanalını tıkayabilir ve bu nedenle kanalların üst kısımları dilatasyona uğrayabilir (13).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), PDAK'larını histopatolojik özelliklerine göre derecelendirmiştir. Bu sınıflandırmaya göre iyi farklılaşmış tipte bezsel yapılar belirgin ve müsin üretimi yoğun gözlenir. Mitotik figür sayısı mikroskopik incelemede 10x büyütmede 5'tir. Pleomorfizm ve polarite kaybı azdır. Orta derecede kanal benzeri yapılar ve tubuler bezler gözlenir ve düzensiz müsin üretimi vardır. Mitotik figür sayısı 10x büyütmede 6-10 arasındadır. Orta derecede pleomorfizm gözlenir. Kötü diferansiye tipte ise kötü diferansiye bezler, mukoepidermoid ve pleomorfik yapılar mevcuttur. Müsin üretimi gözlenmez. Mitotik figür sayısı 10x büyütmede 10 ve üzeridir. Belirgin pleomorfizm ve çekirdek boyutunda artış dikkati çeker (14-16).

7,12-Dimetil benzantrasen (DMBA), hücre moleküler mekanizmasında önemli genetik değişimlere yol açarak kanser oluşumuna katkı sağlar (17-19). DMBA implantasyonu, pankreas tümörlerinin oluşturulmasında ve araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (20-22). Hayvan modelleri, PDAK'ların genetiğinin ve tümör biyolojisinin anlaşılmasına hizmet etmektedir.

Pankreas tümörlerinin tanısında bazı serum tümör belirteçleri mevcuttur. Fakat bunların duyarlılık ve özgünlük değerleri kısıtlıdır. Karbonhidrat antijen (CA 19-9), Karsinoembriyjenik antijen (CEA) ve Karbonhidrat antijen 242 (CA 242) pankreas kanserleri için kullanılır. Bunlar birlikte kullanıldığı takdirde özgünlük değerleri artar (23-26).

Pankreatik stellate hücreler MMP-2, MMP-9, MMP-13 ve metalloproteinaz doku inhibitörleri TIMP-1, TIMP-2'yi sentezleme yeteneğine sahiptir. Pankreasta meydana gelen lezyonlarda pankreatik stellate ile artan MMP-2 sekresyonu bazal membranın parçalanmasına neden olarak bezlerde fibrozis gelişimine yol açan patolojik fibriller kollajenin birikimini kolaylaştırır (27). Pankreas kanserlerinde yoğun, dezmozoplastik stromal reaksiyon mevcuttur ve bu dezmozoplastik reaksiyon tümörün cerrahi operasyonla uzaklaştırılmasını zorlaştırır (28). Ayrıca uzak organlara metastaz için matriks metalloproteinazlar önemlidir (29, 30).

Pankreas tümörleri de dâhil olmak üzere farklı kanser türlerinde matriks metalloproteinazlardan MMP-2 enziminin varlığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (31). Tümör progresyonunun farklı aşamalarında MMP'ler mevcuttur ve MMP-2 angiogenezis için gerekli bir enzimdir (32). Tümör ilişkili angiogenik faktörler subendotelial membranın hasarı ile sonuçlanan vasküler permeabilite değişikliğine

neden olur. Angiogenesis için endotel hücrelerinin migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriksin proteolizisi gereklidir (33). Bazı kanser türlerinde, meme kanseri, diffüz gastrik kanser ve ovaryum kanseri gibi olgularda MMP-2 enzimi önemli prognostik bir faktördür (34-37). Ovaryum kanserlerinde MMP-2 enziminin varlığı tedavi sonrası iyileşme, tümörün çapı, derecelendirilmesi ile yakından ilişkilidir (37). Pankreas kanserlerinde mRNA seviyesinde MMP-2 aktivitesinin arttığı, normal pankreas dokusunda MMP-2 enzime ait mRNA düzeyinde farklılık olmadığı gözlenmiştir (38). Pankreas kanserlerinde stromal ve tümöral hücrelerde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı mevcuttur ve pankreas tümörlerinde gözlenen yoğun dezmozoplazik reaksiyonlarda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlıkları ortaya konmuştur (39, 40). Tümörle ilişkili makrofajlar ve nötrofiller solid tümörlerde kötü klinik tablo ile ilişkilidir. Tümör ilişkili nötrofiller metastatik tümörün mikro çevresinde baskın olarak MMP-9 salgırlar (41).

Matriks metalloproteinaz ailesinin şu ana kadar yaklaşık 28 üyesi ortaya konmuştur. MMP'ler fizyolojik ve patolojik doku yıkımında görev alan ekstrasellüler enzimlerdir (42). Ekstrasellüler matriks (ESM), tümör dokusunun büyümesi, tümör hücresinin yayılımını ve metastazını önlemek amacıyla bir engeldir ve kanser hücreleri bu engeli aşmak için metalloproteinazlara ihtiyacı vardır (43). Kanser hücrelerinin yayılımı için ESM'nin yıkılması gerekir (44).

Serum ve doku MMP-9 seviyeleri, PDAK olgularında, kronik pankreatitis ve normal pankreasa sahip insanlara göre önemli düzeyde yüksektir (45).

Normal pankreas dokusunda asiner ve islet hücrelerinin MMP-2 yönünden negatif ya da hafif boyanma özelliği gösterdikleri bildirilirken, duktal epitel hücrelerinde boyanma rapor edilmemiştir. Pankreas lezyonlarında; hiperplazi, atipik hiperplazi ve invazif karsinomaya doğru gittikçe MMP-2 enziminin immunohistokimyasal boyanma özelliği artar (46).

Makrofajlar ile infiltre pankreas dokusunda asiner ve tubuler hücreler farklılaşmaya uğrar. Makrofajlardan salgılanan yangısal sitokinler matriks metalloproteinazlar ile birlikte asiner hücrelerin duktal hücrelere metaplazisine neden olur (47).

Meme kanserlerinde, immunohistokimyasal boyamalar sonucunda MMP-9 enzim varlığının arttığı bildirilmiştir. Uzak organ metastazı ve tümörün derecelendirilmesi yönünden MMP-9 enzim varlığı arasında bir ilişki mevcuttur. Bu sebeple MMP-9

enzim varlığı meme tümörlerinde prognostik faktör olarak kullanılabilen fakat MMP-2 salınımı ile prognoz arasında herhangi bir korelasyon olmadığı vurgulanmıştır (48).

PDAK'larda, artan MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı mRNA ve protein seviyelerine bakılarak bildirilmiştir. MMP-2 enzim varlığı immunohistokimyasal boyamalarda 75 pankreas kanseri dokusundan 50 olguda ve MMP-9 enzim varlığı ise 45 tümöral pankreas dokusunun 19'unda saptanmıştır. Normal pankreas dokusunda MMP-2 enziminin varlığı ise zayıftan orta boyanmaya özelliğine değişen derecelerde var olduğu gösterilmiştir (49). Bir diğer çalışmada MMP-2 ekspresyonu, pankreas kanser hücrelerinde ve dezmoplazik yapılarda da bildirilmiştir (50).

Akciğer kanserlerinde, serumdaki MMP-9 enzimi ile bu tümörlerin erken aşaması ve prognoz yönünden önemli bir ilişkiye işaret edilmiştir (51, 52).

Yapılan bir çalışmada, pankreas tümörlerinde MMP-9 ve MMP-2 enzimlerinin, normal pankreas dokusuna göre mRNA seviyesinde daha yüksek oldukları bildirilmiştir. PDAK tümörlerinin takibinde serum MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin incelenmesi önemlidir (53). Serum MMP-9 enzimin varlığı PDAK'ların teşhisinde, metastazında ve prognozunda klinik öneme sahiptir. PDAK'ların kronik pankreatitis ve normal pankreas dokusuna göre serumda MMP-9 enziminin varlığı yüksek bulunmuştur. Serum MMP-9 ve matris metalloproteinaz inhibitörü TIMP-1 enzimlerinin pankreas tümörlerinde birlikte değerlendirildiğinde klasik tümör belirteçlerine (karbonhidrat antijen) CA 19-9, karsinoembriyonik antijen (CEA) göre prognostik duyarlılığı daha yüksek olduğu bildirilmiştir (54).

Bu tez çalışmasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na başka bir araştırma projesi kapsamında gönderilen ve pankreas adenokarsinom tanısı konulan 46 adet sıçan pankreas dokusunda immünhistokimyasal yöntem ile MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlıklarının gösterilmesi ve bu belirleyicilerin histopatolojik özellikler, patogenez ve prognoz üzerine olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda çalışmanın amaçları maddeler halinde şöyle özetlenmiştir:

1. Yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMŞ) ve sakkaroz tüketen sıçanlarda DMBA uygulamasının pankreas dokusunda meydana getirdiği değişikliklerin histopatolojik olarak incelenmesi.
2. Histopatolojik olarak pankreas adenokarsinom tanısı konulan tümör dokularında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin immunohistokimyasal yöntemle incelenmesi.
3. Sıçanların pankreas adenokarsinomlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin patogenez yönünden değerlendirilmesi.
4. Sıçanlarda meydana getirilen pankreas adenokarsinomlarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin farklı beslenme modellerine (YFMŞ ve sakkaroz tüketen sıçanlar) göre karşılaştırılması.
5. Pankreas kanserleri için hayvan modelleri insanlardaki pankreas tümörlerine benzer olması sebebiyle hem insan hem de hayvanların pankreas tümörlerinin patogenezinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Anatomi

Pankreas lobüllü yapıda olup, ampulla vater ile duodenuma bağlıdır. İnsanlarda pankreas dokusu baş, boyun, gövde ve kuyruk olarak ayrılır (55). Sıçanlarda pankreas kanallarının sayısı 15 ile 40 arasında değişkenlik gösterir ve tüm kanallar safra kanalına açılır (56). Sıçan pankreası büyük diffüz bir organdır. Sıçanlarda bu organ gastrosplenik, duodenal ve biliyer olmak üzere 3 bölüme ayrılır (57).

Histoloji

Pankreas stroması en dıştan ince bir bağ doku ile çevrilidir ve bu bağ dokusu organı lobüllere ayırır. Pankreas lobülleri tubuloasiner ve intralobüler bezlerden oluşur (58).

Pankreas, sindirim enzimleri ve hormonlar üreten endokrin ve ekzokrin bir salgı bezidir (59). Ekzokrin pankreas salgıladığı sindirim enzimlerini duodenuma boşaltan tubulo-alveoler bir bez yapısındadır (58). İnsanlarda yetişkin bireylerde pankreasın yaklaşık % 95'i ekzokrin hücrelerden oluşur (60). Pankreasın ekzokrin bölümünde parotis bezinin yapısına benzeyen asiner bezler mevcuttur. Asiner hücrelerde lümene doğru ilerleyen sentroasiner hücreler gözlenir. Sentroasiner hücreler interkalat kanalın intraasiner bölümünü oluşturur. Asiner hücrelerin lümene bakan sitoplazmalarında zimojen salgı granülleri vardır (59).

Langerhans adacıkları pankreas dokusunun yaklaşık % 1-2'sini oluşturur. Pankreasın endokrin kısmını oluşturan Langerhans adacıklarında bulunan asidofil A hücreleri glukagon, bazofilik B hücreleri ise insülin hormonlarını salgılar. İnsülin ve glukagon karbonhidrat metabolizmasında önemlidir (61).

Tubulo-asiner hücreler salgılarını enine kesitte kübik görüntülü, uzun ve dar interkalat kanallara akıtır. İnterkalat kanallar interlobüler kanallarla ilişkilidir. Pankreas dokusu tripsinojen, amilaz, lipaz gibi pankreatik enzimleri ihtiva eder (61).

Asiner hücrelerin çekirdeklerini çevreleyen sitoplazmaları yoğun biçimde bazofilik boyanır. Bu hücreler sitoplazmalarında yoğun endoplazmik retikulum ve çok sayıda mitokondriye sahiptir. Zimojen granülleri endoplazmik retikulumda sentezlenen proenzim içerdiği için boyamalarda eozinofilik boyanır (58).

Pankreas Hastalıkları

Pankreas hastalıkları endokrin ve ekzokrin kısmında olmak üzere iki temel grupta incelenebilir (62).

Ekzokrin Pankreasta Gözlenen Hastalıklar

- 1) Doğusal anomaliler
- 2) Dejenerasyon, nekroz, atrofi
- 3) Köpeklerde pankreatik asiner atrofi
- 4) Ekzokrin pankreas yetmezliği
- 5) Akut pankreatik nekroz
- 6) Akut ve kronik pankreatitis
- 7) Pankreasın paraziter hastalıkları
- 8) Ekzokrin pankreasta hiperplastik ve neoplastik lezyonlar

Endokrin Pankreasta Gözlenen Hastalıklar

- 1) İlet hücrelerinin gelişimsel anomalileri
- 2) İlet hücrelerinin dejeneratif lezyonları (Diabetes mellitus, atrofi, nekroz, amiloid, skleroz)
- 3) İlet hiperplazi ve nesidioblastozis
- 4) İlet tümörleri (İnsulinoma, Gastrinoma, Glukonoma, PPoma)

Pankreas Tümörleri ve Sınıflandırılması

Ekzokrin pankreas tümörleri WHO tarafından 2010 yılındaki sınıflandırmasına göre şu şekilde sınıflandırılır (16);

Epitelyal Tümörler

Benign

Seröz kistadenom

Asiner hücreli kistadenom

Premalign Lezyonlar

Pankreatik intraepitelyal neoplazi-3 (PanIN3)

Hafif veya orta derecede displazi içeren intraduktal papiller musinöz tümör

Şiddetli derecede displazi içeren intraduktal papiller musinöz tümör

İntraduktal tubulopapiller tümör

Hafif veya orta derecede displazi içeren musinöz kistik tümör

Şiddetli derecede displazi içeren musinöz kistik tümör

Malign

Duktal adenokarsinom

Adenoskuamöz karsinom

Kolloid karsinom

Hepatoid karsinom

Meduller karsinom

Taşlı yüzük hücreli karsinom

Andiferensiye (anaplastik) karsinom

Osteoklast benzeri dev hücreli andiferensiye karsinom

Asiner hücreli karsinom

Asiner hücreli kistadenokarsinom

İnvaziv karsinom ile ilişkili intraduktal papiller musinöz tümör

Miks asiner duktal karsinom

Miks asiner nöroendokrin karsinom

Miks asiner nöroendokrin duktal karsinom

Mikst duktal nöroendokrin karsinom

İnvaziv karsinom ile ilişkili musinöz kistik tümör

Pankreatoblastom

Seröz kistadenokarsinom

Solid psödopapiller tümör

Nöroendokrin tümörler

Matür Teratom

Mezenkimal Tümörler

Lenfomalar

Sekonder Tümörler

Pankreas Duktal Adenokarsinomları

Epidemiyoloji

Pankreas duktal adenokarsinomları (PDAK), insanlarda sık görülen kanser türleri arasındadır (1-3). PDAK, gelişen ülkelerde önemli bir sağlık problemidir ve ölümcüldür (4). Pankreas kanserleri insanlarda sıklıkla 60-80 yaş aralığında gözlenir (3, 5). Genç yaşlarda, erkeklerde kadınlardan daha fazla görülürken, yaş ilerledikçe kadın erkek arasındaki görülme sıklığı ve oranları eşitlenir (6).

Türkiye Sağlık Bakanlığı 2009 yılı kanser istatistiklerine göre, pankreas kanserleri erkeklerde ilk 10 kanser türleri içerisinde görülmektedir (63). Değişen diyet, genetik ve çevresel faktörler gibi etkenler pankreas kanserini önemli bir hale getirmiştir (64).

Pankreas tümörleri gastro-intestinal kanalın metastatik tümörleri için elverişli bir bölge olmasına rağmen hayvanlarda bu tümörler nadir gözlenir (65).

İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda cinsiyet predispozisyonu net değildir. Tümörün dişi köpeklerde görülme yaşı ortalama 10'dur. Kedilerde ise görülme yaşı ortalama 12'dir (65). Airedale Terrier ve Boxer ırkı köpekler PDAK için yatkındır. Yaşlı

hayvanlarda PDAK daha sıklıkla gözlenmesine rağmen 3 yaşında olan köpeklerde de tümöre rastlanmıştır. Pankreas duktal adenokarsinomları ekzokrin pankreas tümörleri içerisinde en yaygın olanıdır (66). At, domuz, koyun ve sığırdada nadir gözlenir (62, 66).

Etiyoloji

PDAK'ların etiyolojisi net değildir. İnsanlarda risk faktörleri arasında sigara kullanımı, yağlardan zengin beslenme, kronik pankreatitis, kalıtsal pankreatitis, diabetes mellitus mevcuttur (3, 5, 7-9). Beta- naftilamin veya benzerlerine maruz kalan insanlarda bu tümörlere rastlanıldığı bildirilmiştir (8).

Pankreas kanserlerinde hiperglisemi önemlidir. Hiperglisemi hidrojen peroksit aracılığı ile pankreas kanseri hücrelerinin invazyon ve göç yeteneklerini artırır (67).

İnsanlarda sigara kullanımı, etten ve yağdan zengin beslenme, alkol tüketimi, metilksantin içeren içecekler (kahve gibi), radyasyona ve kimyasal karsinojenlere maruz kalma pankreas kanserlerinde etkili faktörlerdir (62).

Pankreatik tümörlerin etiyolojisi kedi ve köpeklerde belli değildir (65). Fare, sıçan ve hamsterlarda, nitrozamin potansiyel pankreatik asiner karsinojendir. İki gri Collie ırkı genç köpekte gözlenen kronik pankreatitisin, bu iki köpekte rapor edilen PDAK için katkı sağlayabileceği rapor edilmiştir (62).

Klinik Bulgular

Kedi ve köpeklerde PDAK'ları ile birlikte gözlenen yaygın klinik bulgular nonspesifiktir. Anoreksi, kilo kaybı, kusma, abdominal ağrı, konstipasyon, distensiyon, letarji ve depresyondur. Abdominal ağrı veya elle palpasyonda abdominal kitle bazen hissedilebilir (62, 65). Köpeklerde pankreastaki kitle kolay palpe edilemez. Kedilerde ise sıklıkla kitlenin boyutunun köpeklere göre daha büyük olması nedeniyle abdomende kitlenin varlığı daha kolay hissedilebilir (65). Yoğun peritoneal tümöral yayılım mevcutsa hayvanda asites gözlenebilir. Pankreas kanallarının tamamen tıkanması veya pankreasın aşırı neoplastik yıkımı ile ilişkili ekzokrin pankreas yetmezliği veya diabetes mellitus gözlenebilir. Pankreastaki tümörler safra kanalına basınç yapıp safra akmasını engelleyebilir. Safra akışının engellenmesi ile hayvanda sarılık gözlenebilir. Pankreastaki kitlenin karaciğere metastaz yapması ile pankreas tümörüne spesifik klinik bulgular olmayan karaciğer fonksiyon bozuklukları şekillenir. Pankreatik duktal adenokarsinoma sahip az sayıda köpekte nekrotik adipositlerin mineralizasyonu ile

multifokal nekrotizan pannikulitis gözlenmiştir. Abdominal ventral bölge, bacaklar ve genellikle yüz bölgesini etkileyen paraneoplastik alopesi kedilerde pankreatik adenokarsinomu ile gözlenmiştir. Hiperkalsemiye neden olan psödohiperparatroidizm olan bir köpekte pankreatik adenokarsinom tanısı konulmuştur (62). Pankreas adenokarsinomlarında proteolitik enzimlerin koroziv etkisi sonucu primer tümörde kistik değişiklikler ve omental, peritoneal yağ dokusunda nekrotizan steatitis gözlenebilir (66).

Makroskobik Bulgular

PDAK'lar, solid, sınırları belirgin tümörlerdir. Bu tümörler pankreas dokusuna doğru uzanan birden çok kitleler halinde gözlenebilir. Bu pankreas tümörleri oldukça skiröz tipte olduğu için kesit yüzünü yangısal iyileşme dokusundan ayırt etmek zor olabilir. Kesit yüzü sarımtırak-gri, beyaz renktedir. Mineralizasyon alanları ve bazı tümörlerde müsin dolu kistler gözlenebilir (62). İnsanlarda genellikle çapı 2-5 cm arasında olan, kıvamı sert tümörlerdir. Tümöral kitlede hemoraji, nekroz, kistik değişiklikler veya diffuz büyüme gözlenebilir (7).

Köpeklerde bu tümörler genellikle pankreasın orta kısmında yer alır. Fakat kedilerde bu tümörler diffüz gözlenir ve kronik pankreatitis veya noduler hiperplazi ile karışabilir. Özellikle kedilerde kitlenin makroskobisinde, yumuşamış ve nekroz alanları belirgin hale gelmiş olabilir ve fokal veya diffuz hemorajik alanlar yaygındır (66).

Mikroskobik Bulgular

PDAK, WHO 2010 yılı derecelendirme sistemine göre iyi, orta ve kötü diferensiyeye olarak sınıflandırılmaktadır (16). İyi diferensiyeye adenokarsinomda; sınırları belirgin bez yapısı gözlenir ve silindirik veya kübik epitele sahip, yuvarlak veya oval uniform çekirdek ile dağınık kromatinli az sayıda nükleer pleomorfizm gösteren neoplastik hücreler mevcuttur. Orta diferensiyeye tipte ise; bezsel yapı iyi diferensiyeye göre daha az belirgindir ve tamamlanmamış bezsel lümenler ile nükleer pleomorfizm dikkati çeker. İyi diferensiyeye göre hücre çekirdekleri daha büyük ve düzensizdir, mitoz daha yaygındır. Kötü diferensiyeye olanda, solid alanlar ve belirgin infiltratif hücreler ile kötü farklılaşmış, belirgin olmayan bez yapıları gözlenir. Kötü diferensiyeye tipte diğerlerine göre daha az müsin üretir, büyük garip şekilli (bizar) nükleus ile belirgin nükleer pleomorfizm ve atipik mitoz yaygındır (10, 14, 16). Bez epitellerinde malignite bulguları belirgin nükleer pleomorfizm, polarite kaybı, belirgin nükleolus ve mitotik

aktivitedir. İnsanlarda gözlenen olguların çoğunluğunda perinöral invazyon mevcuttur. PDAK'ların bazılarında kan damarlarına invazyon görülmektedir (8).

Kötü diferansiye pankreas tümörleri nadir gözlenir. Neoplastik bezler pankreas parankiminde, asiner hücreler ve Langerhans adacıklarının arasında dağınık halde dikkati çeker. Bu infiltrasyon ile beraber belirgin dezmoplastik bir reaksiyon mevcuttur (7)

Pankreas adenokarsinomları için yaygın olarak WHO'nun belirlediği histopatolojik derecelendirme sistemi kullanılır. Bu sistemde glandüler diferensiyasyon, müsin üretimi, mitoz, nükleer özellikler Tablo-1'de verilmiştir (14, 16). Pankreas tümörlerinde patolojik evrelendirme TNM sınıflandırmasına dayanır. Primer tümörün boyutu ve çevre dokuya invazyonunun olup olmamasına göre değerlendirilir (7, 16).

Tablo-1 Pankreas Duktal Adenokarsinomların Histopatolojik Derecelendirilmesi

Tümör Derecesi	Glandüler diferensiyasyon	Müsin Üretimi	Mitoz	Nükleer Görünüm
Derece I	İyi diferansiye bezler	Yoğun	5	Hafif polimorfik
Derece II	Orta derece diferansiye duktuslar ve tubuler bezler	Düzensiz	6-10	Orta derece polimorfik
Derece III	Az diferansiye bezler, yoğun mukoepidermoid ve pleomorfik yapılar	Az veya yok	10 ve üzeri	Belirgin polimorfik ve artmış boyut

Bu tablo Dünya Sağlık Örgütü Kaynağından (14, 16).

Pankreas kanserleri için farklı evrelendirme sistemleri geliştirilmiştir (68). Rindi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (68), Avrupa Nöroendokrin Topluluğunun (European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS TNM) oluşturduğu TNM sistemi diğer evrelendirmelere göre daha üstün ve klinik çalışmalarda daha yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Primer tümörün büyüklüğüne (T), bölgesel lenf yumrularının durumuna (N) ve metastaz olup olmamasına göre (M) olarak ayrılmaktadır (69).

Primer Tümör (T)

TX Primer tümör değerlendirilemiyor

T0 Primer tümör ile ilgili bulgu yok.

T1 Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm'den küçük

T2 Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2-4 cm aralığında

T3 Tümör pankreasta sınırlı ve çapı 4 cm'den büyük yada duodenum veya safra kanalına invaze

T4 Tümör komşu organlara (mide, dalak, kolon, adrenal bez) veya büyük damarlara invaze

Bölgesel Lenf Yumruları (N)

NX Bölgesel lenf yumruları değerlendirilemiyor

N0 Bölgesel lenf yumrularına metastaz yok

N1 Bölgesel lenf yumrusuna metastazı

Uzak Metastaz

MX Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz (69)

Tanı

PDAK'ları, ekstrapankreatik adenokarsinomlardan ayırt edebilecek kesin sonuç veren immunohistokimyasal belirteç yoktur. Sitokeratin 7 (CK 7), Sitokeratin 8 (CK 8), Sitokeratin 18 (CK 18), Sitokeratin 4 (CK 4) ve Sitokeratin 19 (CK 19) pankreasın normal duktal ve sentroasiner hücrelerde varlığı gözlenir. PDAK'larda da aynı sitokeratinlerin varlığı dikkati çeker. Müsin proteinlerinden; MUC1, MUC3, MUC4, MUC5/6 salınımı pankreas duktal adenokarsinomların çoğunda gözlenmektedir. Tümör antijenlerinden CA125 ve CA19-9 pankreas duktal adenokarsinom vakalarında gözlenir. Fakat bunlar birlikte kullanıldığı takdirde % 95 başarı getirir (14). CA 19-9 ve CEA belirteçleri birlikte kullanıldıkları zaman klinik yönden yararlı olur (70). Serum CA19-

9, pankreas kanseri olgularında daha az spesifite gösterir. Pankreas kanserlerinde yanlış negatif sonuç verebilir veya tıkanma sarılığı varlığında yanlış artan pozitiflik vermektedir. Asemptomatik hastaların takibinde rolü yoktur (71). CA19-9 ilerlemiş veya metastatik olanlarda kemoterapi sonrası prognozu incelemek amacıyla kullanılmaktadır (72). Cerrahi operasyon sonrası CEA ve CA 19-9 seviyeleri PDAK'larda prognoz yönünden önemlidir (73).

Görüntüleme yöntemleri olarak bilgisayarlı tomografi ve endoskopik ultrasonografi kullanılabilir fakat iki yöntem arasında hassasiyet bakımından farklılıklar mevcuttur (74). Bilgisayarlı tomografide 3 cm'den daha küçük lezyonların teşhisindeki sensitivite değeri endoskopik ultrasona göre oldukça düşüktür (75). Bilgisayarlı tomografide rezeke edilebilir görünen pankreas tümörlerinin üçte birinin ameliyat esnasında rezeke edilebilir olmadığı gözlenir (76).

PDAK'lar infiltrate olduğu zaman, bazen pankreas yangısına benzeyen klinik bulgulara neden olabilir. Bu tip durumlarda klinik tabloda amilaz ve lipaz enzim değerlerine bakılarak, bu değerlerde yükselme olduğu gözlenebilir. Pankreas tümörleri karaciğer lezyonları ile beraber seyrettiği zaman kronik obstruktif sarılıkta gözlenen hiperbilirubinemi, (Alkale fosfataz) ALP'de belirgin yükselme ve (Alanin aminotransferaz) ALT'de hafif yükselme gibi laboratuvar bulguları gözlenebilir. Sarılık olmadan, enzim konsantrasyonlarında artış gözleniyorsa metastatik bir hastalık şüphesi oluşturabilir. Abdomenin radyolojik incelenmesinde pankreas bölgesinde kitlenin varlığı saptanabilir, fakat spesifik bir bulgu olmayabilir (77).

Prognoz

Pankreas tümörlerinde uzak bölgelere yaygın metastazlar gözlenir ve bu durum genellikle klinik semptomlar belirgin hale geldiği zaman anlaşılır. Lokal infiltratif büyümeler safra kanalını tahrip edebilir. Tahrip sonrasında sarılığa ve serum karaciğer enzimlerinde belirgin artışa neden olur. Sıklıkla periton, mezenteriyum ve yakın bölgedeki gastrointestinal organlara metastaz yapar. Bu organ ve dokuların dışında akciğer, karaciğer ve az sıklıkla dalak, böbrek ve diyaframa metastaz yapar. Tümörün hızlı lokal büyümesi, erken metastaz ve proteolitik yan etkiler pankreatik adenokarsinomların daha agresif ve ağırlı bir tümör haline gelmesine yol açar (66).

Matriks Metalloproteinazlar

MMP'ler fizyolojik ve patolojik doku yıkımında görev alan ekstrasellüler enzimlerdir. Matriks metalloproteinaz ailesinin şu ana kadar yaklaşık 28 üyesi ortaya konmuştur (42). Ekstrasellüler matriks (ESM), tümör dokusunun büyümesi, tümör hücrelerinin yayılımını ve metastazını önlemek amacıyla bir engeldir ve kanser hücrelerinin bu engeli aşmak için metalloproteinazlara ihtiyacı vardır (43). Kanser hücreleri için ESM'nin yıkılması gerekir (44).

Tüm matriks metalloproteinazlar kendilerine özgü domainlere sahiptir ve katalitik aktiviteleri, bu bölgede yer alan çinkoya bağlıdır. Enzimatik aktivitelerinin salınımı ve stabilitesi için kalsiyum iyonları ile yapısında bulunan çinko iyonları gerekir. MMP'ların proteolitik aktiviteleri matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) ile inhibe edilir (78).

Tümör olgularında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı farklı yöntemlerle (immunohistokimya, zimografi, in situ hibridizasyon gibi) tümöral dokularda gösterilmiştir (79, 80). Periferik kan ve doku örneklerinde ELISA ile immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin artmış düzeyleri tespit edilmiştir (81).

MMP'lar ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından tanımlanmışlardır (82). Matriks metalloproteinazların primer yapısı incelendiği zaman farklı bölgeler içerdikleri gözlenmektedir (43).

- 1. Predomain bölge:** İlk bölgedir ve 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptid yapısındadır. Molekülü salınım için hedefleyen ve daha sonrasında ortamdan uzaklaştıran sinyal peptid dizesidir.
- 2. Prodomain bölge:** Bu bölgenin yapısında bulunan sistein rezidüleri enzimin latent formunda korunmasını ve kalmasını sağlar. Bu bölgenin uzaklaştırılması inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesine yol açar.
- 3. Katalitik bölge:** Histidin rezidüleri ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli ve önemli olan çinko iyonu içeren bölgedir ve yapısında 170 aminoasit barındırır.
- 4. Prolinden zengin bölge:** Bu bölgeye menteşe bölgesi de denir. Katalitik ve hemopeksin arasında yer alan kısımdır.
- 5. Hemopeksin benzeri bölge:** Hem bağlayan moleküllere benzeyen son bölgedir.

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada farklı tip pankreas tümörüne sahip bireylerde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin preoperatif ve postoperatif dönemdeki seviyeleri karşılaştırılmış ve rezeksiyona uygun olan tümörler ile rezeksiyona uygun olmayan tümörler arasında, her iki enzimin diagnostik açıdan önemli olabileceği vurgulanmıştır (83). Bazen de, MMP-2 enziminin varlığı tümörlerde uygulanan tedaviye yanıt ve iyi prognoz açısından değerlidir (84).

Pankreatik stellate hücreler MMP-2, MMP-9, MMP-13 ve metalloproteinaz doku inhibitörleri TIMP-1, TIMP-2'yi sentezleme yeteneğine sahiptir. Pankreasta meydana gelen lezyonlarda pankreatik stellate hücrelerinden salınan ve seviyesi artan MMP-2 sekresyonunun bazal membranın parçalanmasına neden olarak bezlerde fibrozis gelişimine yol açan patolojik fibriler kollajenin birikimini kolaylaştırdığı ifade edilmiştir (27). Pankreas kanserlerinde yoğun, dezmoplastik stromal reaksiyon mevcuttur ve bu dezmoplastik reaksiyon tümörün cerrahi operasyonla uzaklaştırılmasını zorlaştırır (28).

Pankreas kanseri oluşturulan tümörlerde baskın olarak tümör çevresindeki stroma dokusunda MMP-2 enziminin varlığı immunohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir. (30). Pankreas kanserleri dâhil olmak üzere farklı kanser türlerinde metalloproteinazlardan MMP-2 enziminin varlığı incelenmiştir (31). Tümör progresyonun farklı aşamalarında MMP'ler mevcuttur ve MMP-2 angiogenesis için gerekli bir enzimdir (32). Tümör ilişkili angiogenik faktörler subendotelial membranın hasarı ile sonuçlanan vasküler permeabilite değişikliğine neden olur. Angiogenesis için endotel hücrelerinin migrasyonu, proliferasyonu ve ekstrasellüler matriksin proteolizisi gereklidir (33). Bazı kanser türlerinde, meme kanseri, diffüz gastrik kanser ve ovaryum kanseri gibi olgularda MMP-2 önemli prognostik faktördür (34-37). Ovaryum kanserlerinde MMP-2 enziminin varlığı tedavi sonrası iyileşme, tümörün çapı, derecelendirilmesi ile yakından ilişkilidir (37). Pankreas kanserlerinde mRNA seviyesinde MMP-2 enziminin arttığı ve normal pankreas dokusunda bu enzime ait mRNA'nın değişmediği gözlenmiştir (38). Pankreas kanserlerinde stromal ve tümöral hücrelerde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı ortaya konmuş ve pankreas tümörlerinde gözlenen yoğun dezmoplazik reaksiyonlarda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin bu alanlarda da gözlendiği bildirilmiştir (39, 40). Tümörle ilişkili makrofajların ve nötrofillerin solid tümörlerde kötü klinik tablo ile ilişkili olduğu ve bu ilişkide nötrofillerden salgılanan MMP-9 enziminin önemli olduğu vurgulanmıştır (41).

PDAK olgularında, serum ve doku MMP-9 seviyeleri kronik pankreatitis ve normal pankreasa sahip insanlara göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (45).

Normal pankreas dokusunda asiner ve islet hücrelerinin MMP-2 yönünden negatif ya da hafif boyanma özelliği gösterdikleri bildirilirken, duktal epitel hücrelerinde boyanma rapor edilmemiştir. Pankreas lezyonlarında; hiperplazi, atipik hiperplazi ve invazif karsinomaya doğru gittikçe MMP-2 enziminin immunohistokimyasal boyanma özelliğinin arttığı bildirilmiştir (46).

Makrofajlardan salgılanan yangısal sitokinler matriks metalloproteinazlar ile birlikte asiner hücrelerin duktal hücrelere metaplazisine neden olur (47).

PDAK'larda, artan MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı mRNA ve protein seviyelerine bakılarak bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada MMP-2 enzim varlığı 75 pankreas kanseri olgusunun 50'sinde ve MMP-9 enzim varlığı ise 45 tümöral pankreas dokusunun 19'unda immunohistokimyasal olarak saptanmıştır. Normal pankreas dokusunda MMP-2 enziminin ise immunohistokimyasal olarak zayıftan orta boyanmaya kadar özellik gösterdiği bildirilmiştir (49). Bir çalışmada artan MMP-2 ekspresyonu, pankreas kanser hücrelerinde ve dezmoplazik yapılarda bildirilmiştir (50).

Tümöral dokularda MMP-2 ve MMP-9 enzimleri tümörü çevreleyen stromal hücrelerde mRNA düzeyinde gösterilmiştir (85, 86).

GEREÇ ve YÖNTEM

Gereç

Hayvan Materyali

Tez çalışması sırasında kullanılan sıçanlar, UAP(Z)- 2011/65 nolu BAP projesi ile desteklenen ‘Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Tüketiminin Obezite ve Pankreas Kanseri Oluşumuna Etkisinin Araştırılması’ başlıklı proje kapsamında Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneylemleri ve Yerel Etik Kurulu (HADYEK-Etik Kurul Onay Belge No: 2011-05/11) izin belgesi ile temin edildi. Proje kapsamında toplam 124 adet, 1 aylık, erkek Sprague Dawley ırkı sıçan satın alındı. Deneylemlere hayvanlar 50 günlük yaşa ulaştığında başlandı. Bu kapsamda hayvanlar YFMŞ, sakkaroz ve kontrol olarak 3 gruba ayrıldı. Deneysel gruplarına ayrılan sıçanlara standart beslemelerine (ticari pelet yem ve su) ilave olarak YFMŞ grubunda %10 oranında fruktoz içeren şeftali nektarı hayvan başına günlük 50-70 gram olacak şekilde tartılarak verildi. Sakkaroz grubundaki hayvanlara %10 oranında sakkaroz içeren şeftali nektarı hayvan başına günlük 50-70 gram olacak şekilde tartılarak verildi. Kontrol grubundaki hayvanlar ise standart beslemeye tabi tutuldu. Bu beslenme rejimleri ile sıçanlar 10 aylık yaşa ulaştıklarında 46 hayvana, genel anestezi altında batın açıldıktan sonra pankreas dokusu kesilerek 9 mg 7,12 Dimetil Benzantrazen (DMBA, D3254, Sigma) implante edildi ve takiben pankreas dokusu dikildi. Tümör oluşumu için 15 aylık yaşa kadar beklendi. Farklı beslenme gruplarındaki hayvanlara aynı cerrahi işlemler DMBA uygulanmaksızın da yapıldı ve tez çalışması için bu hayvanlardan 15 adeti kullanıldı. Geriye kalan 63 hayvan ana projenin diğer deneysel ve analizleri için kullanıldı. Tez çalışması sırasında kullanılan deneysel grupları Tablo-2’de verilmiştir.

Tablo-2 Deneylemlerde kullanılan sıçanların gruplara göre dağılımı

DMBA Uygulanan			DMBA Uygulanmayan		
YFMŞ (n=15)	Sakkaroz (n=16)	Kontrol (n=15)	YFMŞ (n=5)	Sakkaroz (n=5)	Kontrol (n=5)

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrazen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu.

Histopatolojik Preparatların Hazırlanması

Nekropsi sırasında makroskopik bulgular kaydedildikten sonra mikroskopik inceleme amacıyla doku örnekleri %10 formaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat süre ile tespit edildi. Doku örnekleri rutin doku takip işlemleri için doku takip cihazından (Thermo Scientific, Excelsior ES, parti no: A78400111, İngiltere) geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Mikrotom (Leica RM 2155, Almanya) cihazında 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı.

Mikroskopik İnceleme

Binoküler ışık mikroskobu (Olympus, model U-D03, Tokyo, Japonya) ile histopatolojik incelemeler ardından pankreas adenokarsinom tanısı konulan doku örnekleri, MMP- 2 ve MMP-9 enzimlerinin immun boyama özelliklerini değerlendirmek amacıyla immunohistokimyasal yöntemle incelendi. Elde edilen bulgular gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal Boyamalar

İmmunohistokimyasal boyamalar sırasında Thermo-Scientific (Waltham, Amerika) firmasına ait Rabbit anti human RB-9234-PO ve Bioss (Boston, Amerika) firmasına ait Rabbit anti polyclonal bs-0397R kodlu matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) sırasıyla 1/25 ve 1/100 oranlarında sulandırılarak, Abcam (Cambridge, İngiltere) firmasına ait Mouse anti human AB3158 kodlu matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) primer antikorları 1/20 oranında sulandırılarak kullanıldı. Primer antikorların sulandırılması Large Volume Ultrap Diluent (Thermo Scientific, TA-125-UD) ile yapıldı. Sekonder antikor olarak Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Thermo Scientific, TP-015-BN) kullanıldı. Sekonder antikora bağlanmak üzere streptavidin peroksidaz (Thermo-Scientific, TS-015-HR) kullanıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksit (Thermo-Scientific, TA-015-HP) bloklama solüsyonu kullanıldı. Zemin boyanmasının maskelenmesi için protein bloklama solüsyonu (Thermo Scientific, TA-015-UB) kullanıldı. Diaminobenzidine (DAB) kromojen (Thermo Scientific, TA-001-HCX) ile DAB substrat (Thermo Scientific, TA-015-HSX) kullanıldı. Sitrat Buffer solüsyonu (Thermo Scientific, AP-9003-125) kullanıldı.

Hedef organ olan pankreas dokuları lizinli lamlara (Leica, kod 00270) alındı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak amacıyla Bosch marka mikrodalga kullanıldı. Dokular üzerine damlatılan solüsyonların kurumalarını önlemek, nem ortamı yaratmak ve antikorun bir gece + 4 derecede dokuda inkubasyonunu sağlamak için cam malzemeden nemlendirme kutusu kullanıldı.



Yöntem

Nekropsi

Sıçanlara yüksek doz anestezi uygulanarak ötenazileri (HADYEK Etik Kurul Onay Belge No: 2011-05/11) gerçekleştirildikten sonra Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen hayvanların dış bakıları yapıldıktan sonra karın ve göğüs boşluğu açıldı. Çalışma kapsamında hedef organ olan pankreas incelendi. Pankreastaki tümöral oluşumlar cetvel ile ölçülerek boyutları kaydedildi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için pankreas dokuları alındı. Metastaz varlığının olup olmadığını belirlemek için akciğer, karaciğer, kalp, böbrekler, dalak, mide, barsaklar, merkezi sinir sistemi, deri ve periton dokuları alındı. Pankreaslarına DMBA uygulanmayan kontrol grubundan da, histopatolojik ve immunohistokimyasal karşılaştırma yapmak amacıyla aynı doku örneklemeleri yapıldı.

Histopatolojik İnceleme

Nekropsi sonrası alınan dokular % 10'luk formaldehit solüsyonu içerisine alındı. Trimi yapılan dokuların, metastaz varlığının olup olmadığını belirlemek için pankreas dışındaki dokular aynı kasetlere alındı. Pankreas dokusu ise ayrı kasete konuldu. Doku örnekleri, 24 saat oda sıcaklığında tespitite kaldıktan sonra rutin doku takip cihazına alındı. Daha sonra bloklanmış dokular mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesilerek HE ile boyandı. Pankreaslarına DMBA uygulanan ve uygulanmayan grubun, pankreas ve diğer organlarındaki lezyonları kaydedildi. Histopatolojik olarak pankreas duktal adenokarsinom tanısı konulan olgular ile pankreaslarına DMBA uygulanmayan sıçanların pankreas dokuları MMP-2 ve MMP-9 immunohistokimyasal boyama için lizinli lama alındı.

İmmunohistokimya (İHK) İşlemi:

İHK işlemlerinde lizinli lama (Leica, 00270) alınan kesitler sıçanlara özgü ticari MMP-2 ve MMP-9 primer antikoları ile boyandı. Streptavidin Biotin Peroksidaz tekniği kullanıldı (87).

Uygulanan İHK yöntemi ana hatları ile aşağıdaki basamaklardan oluşmuştur:

- 1- Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler lizinli lama alındı.
- 2- Deparafinizasyon işlemi için kesitler 2 defa 10'ar dk süre ile ksilolden geçirildikten sonra, 100 derecelik alkolde 5 dk x 2, 90, 80 ve 70 derecelik alkollerde 5'er dk 2 kez ile dehidre edildi, ardından dokular 5 dk distile su içerisinde yıkandı.
- 3- Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için tamponlu sitrat solüsyonu (pH: 6) içerisine alınan kesitler, 700 watt'lık enerji kullanılarak mikrodalga fırında 5'er dakikalık 4 ısıtma işlemine tabi tutuldu. Isıtma işlemleri arasında buharlaşarak kaybolan tamponlu sitrat miktarının telafisi için yeni tampon solüsyonu eklendi.
- 4- Bu işlem bittiği zaman dokular oda sıcaklığına gelene kadar soğumaya bırakıldı ve oda ısısına gelince distile suda 5 dakika bekletildi.
- 5- Dokular PBS içerisine alınarak 5 dakika yıkandı.
- 6- Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için lamlar nemli odacığa alınıp 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksit dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulandı.
- 7- Dokular 5'er dk süre ile 2 defa fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile yıkandı.
- 8- Protein bloklama solüsyonu (Large Volume Ultra V Block) dokuların üzerini kapatacak şekilde otomatik pipet yardımı ile damlatıldı ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 9- Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi yapılmaksızın lamların üstüne uygun oranda sulandırılmış (Large Volume Ultra Ab Diluent) primer antikor konularak dokular 1 gece +4 derece sıcaklıkta buzdolabında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben primer antikor uzaklaştırıldı ve lamlar 5'er dk süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
- 10- Sekonder antikor dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulandı. Kapalı ve nemli ortamda, 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamlar 5'er dk süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.
- 11- Lamlar üzerine dokuları kapatacak şekilde streptavidin-peroksidaz eklendi ve 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Ardından lamlar 5'er dk süre ile 2 defa PBS ile yıkandı.

12- Lamlar üzerine diaminobenzidine (DAB) kromojen ve DAB substrat karışımı (2 ml DAB Plus Substrat + 40 µl DAB Plus Kromojen) dokular üzerini kapatacak şekilde 20 dk uygulandı, ardından lamlar PBS ile 5 dk yıkandı.

13- Harris hematoksilende doku kesitleri mavileşinceye kadar, 12 dk boyunca karşı boyama yapıldıktan sonra lamlar akar suda 3 dk yıkandı.

14- Lamlar 5'er dk süre ile 70, 80 ve 90 derecelik alkol ve 5 dk x 2 defa 100 derecelik alkolden ve 10 dk x 2 defa ksilolden geçirildikten sonra dokular Entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal Skorlama:

MMP-2 ve MMP-9 primer antikorları ile doku örneklerinin boyaması sonrasında tüm preparatlar ışık mikroskop altında (Olympus, model U-D03, Tokyo, Japonya) incelenerek, DMBA uygulanmış sıçanların adenokarsinomlarındaki tümöral hücreler ile DMBA uygulanmamış sıçanların pankreaslarının boyanma özellikleri incelendi. Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma oranı ve şiddeti 40'luk objektifte farklı 4 alan seçilerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak şu şekilde derecelendirildi (88). Negatif (-)= tümör hücrelerinin % 5'den azında boyanma, 1+ = tümör hücrelerinin % 5-20'unda boyanma, 2+ = tümör hücrelerinin % 20-50'sinde boyanma; 3+ = tümör hücrelerinin % 50-90'inde boyanma, 4+ = tümör hücrelerinin % 90'inden fazlasında boyanma. Boyanma şiddeti de şu şekilde derecelendirildi (89). Negatif (-) =boyanma yok, + = soluk, 2+= orta dereceli, 3+ = güçlü.

İstatistik Değerlendirme:

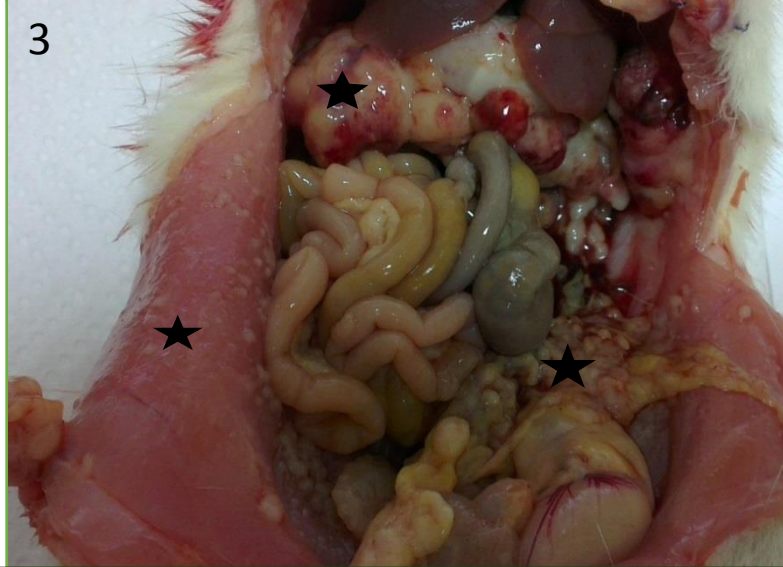
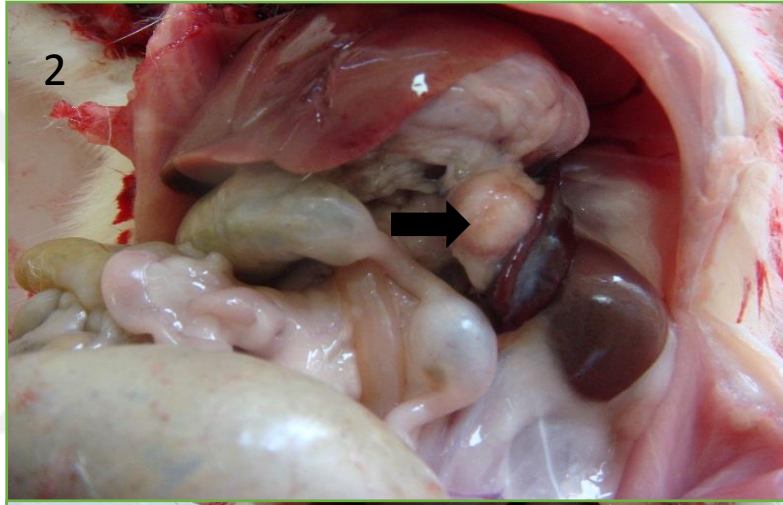
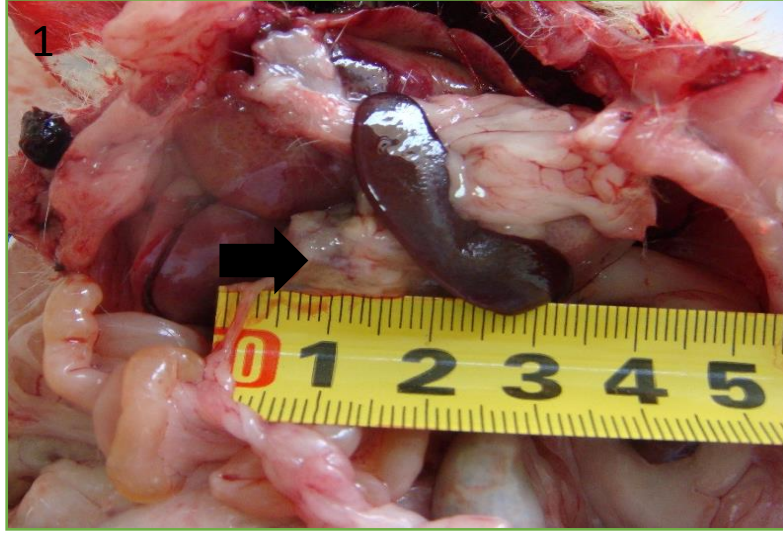
Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics 20 programından faydalanıldı ve U.Ü. Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında çalışan Araş.Gör. Ender Çarkungöz Uzabacı'dan yardım alındı.

Çalışmada yer alan değişkenlerin gruplar arası (grup sayısı >2) karşılaştırması için Kruskal Wallis analizi uygulanırken, sakkaroz ve YFMŞ gruplarının kontrol grubuyla olan farklılıkları Mann Whitney U testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler medyan (minimum-maksimum) şeklinde verildi. Kategorik değişkenler sayı (n) ve (%) olarak verildi. Analiz sonuçları p<0.05 değeri anlamlı kabul edilerek yorumlandı.

BULGULAR

Makroskopik Bulgular

DMBA uygulanan YFMŞ, Sakkaroz ve Kontrol grupları ile DMBA uygulanmayan YFMŞ, Sakkaroz ve Kontrol grupları farklı günlerde ötenazileri gerçekleştirilerek nekropsi sırasında makroskopik bulguları kaydedildi. DMBA uygulanan tüm gruplarda (kontrol grubundan bir hayvan hariç) pankreaslarında yaklaşık 0.5 -2 cm değişen ebatlarda, beyazımtırak, sert kıvamlı, kesit yüzü nekrotik kitleye rastlandı (Şekil-1, 2). DMBA uygulanan YFMŞ grubunda bir hayvanda abdominal dikiş bölgesinde merkezi nekrotik apse odağı gözlemlendi. DMBA uygulanan kontrol grubunda bir hayvanda karın boşluğunda 5 ml kanlı eksudat mevcuttu. DMBA uygulanan YFMŞ grubundan 5, sakkaroz grubundan 5, kontrol grubundan 2 hayvanda dalak serozal katmanının belirgin hale geldiği gözlemlendi. DMBA uygulanan YFMŞ grubundan 6, sakkaroz grubundan 3, kontrol grubundan ise 6 hayvanda pankreasın lobuler yapısının belirgin hale geldiği dikkati çekti. DMBA uygulanan YFMŞ grubunda bir hayvanda karaciğer dokusunda 1 cm ebatlarında beyazımsı sarı renkte multifokal apse odaklarına rastlandı. Metastaz gösteren DMBA uygulanan kontrol grubundaki tek hayvanda karın boşluğunda yaklaşık 50 ml kanlı eksudat gözlemlendi. Peritonun pariyetal yaprağında, diyaframda, omentumda ve mezenteriyumda 0,5 cm ebatlarında multifokal beyazımtırak renkte, sert kıvamlı, kesit yüzü nekrotik kitlelere rastlandı. Midenin serozal katmanına ve pankreasa yapışık 3 x 4 x 3 cm ebatlarında dış yüzü girintili çıkıntılı, sert kıvamlı, sarımtırak renkte, kesit yüzü homojen görünümde bir kitle gözlemlendi (Şekil-3). DMBA uygulanmayan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunun pankreaslarında herhangi bir lezyona rastlanmadı (Şekil-4).

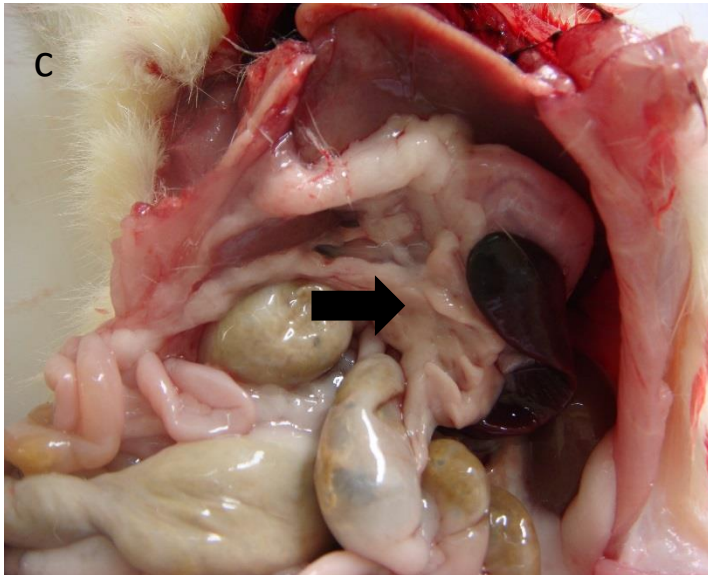
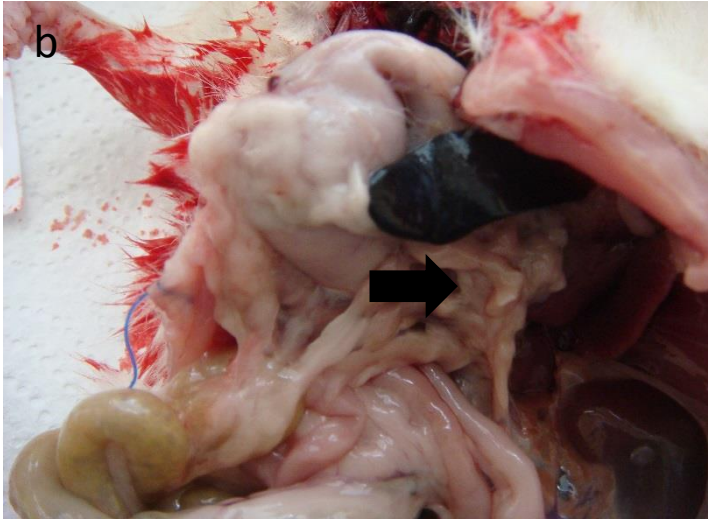
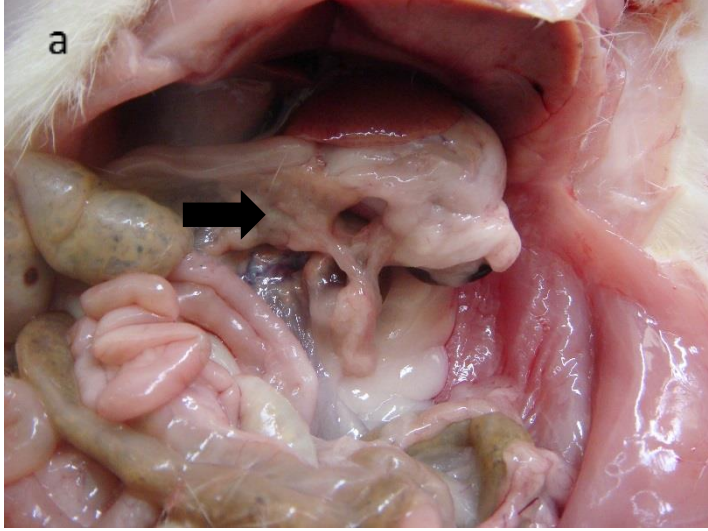


Şekil-1 DMBA uygulanan YFMS grubunda pankreasta gözlenen makroskobik kitlenin görünümü (oklar).

Şekil-2 DMBA uygulanan sakkaroz grubunda gözlenen kitlenin makroskobik görünümü.

Şekil-3 DMBA uygulanan kontrol grubunda bir hayvanda tümöral lezyonlar (yıldızlar).

YFMS: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil benzantrasen

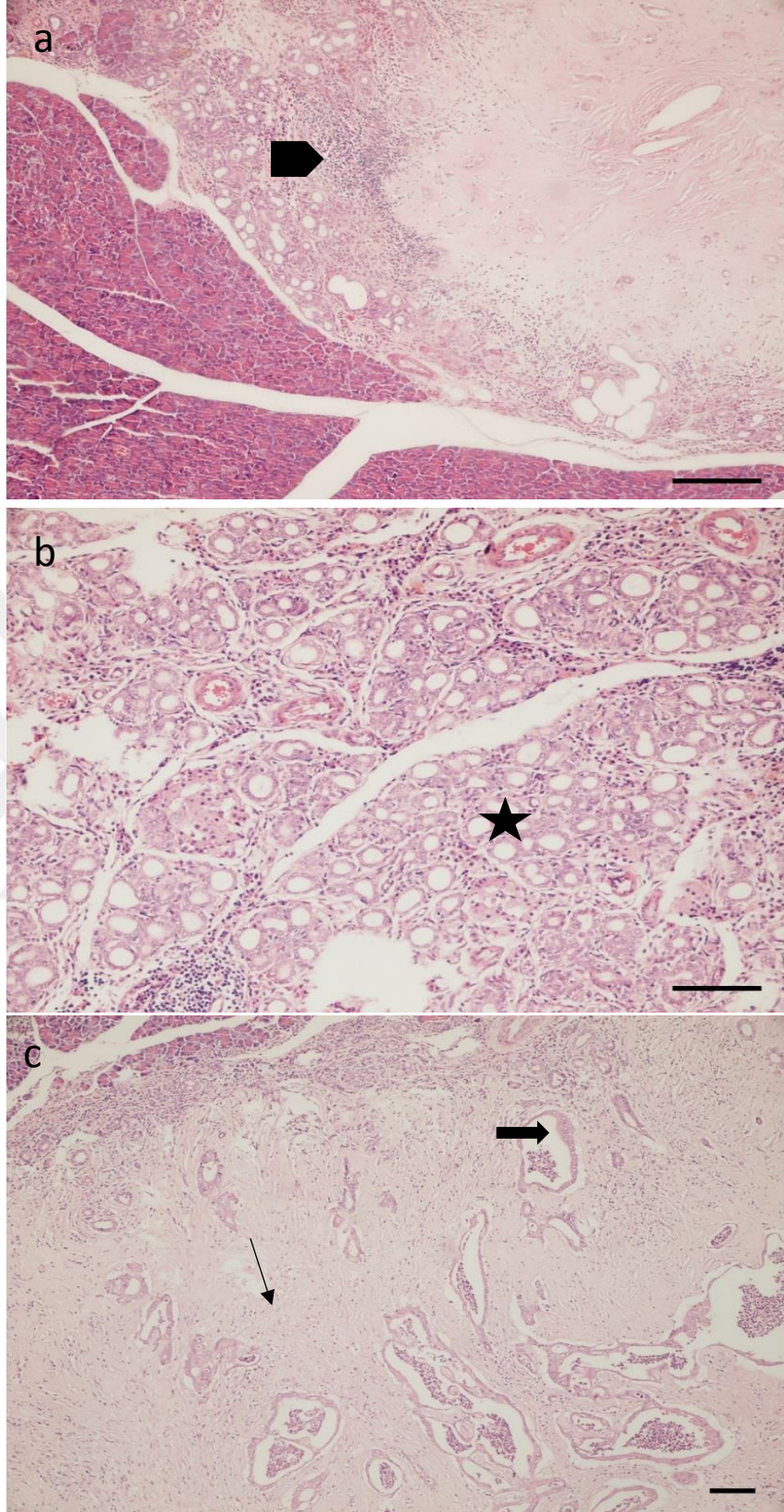


Şekil-4 Sırasıyla YFMS (a), sakkaroz (b) ve kontrol (c) gruplarında (DMBA uygulanmayan) makroskobik normal pankreas görüntüsü (oklar).

YFMS: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen.

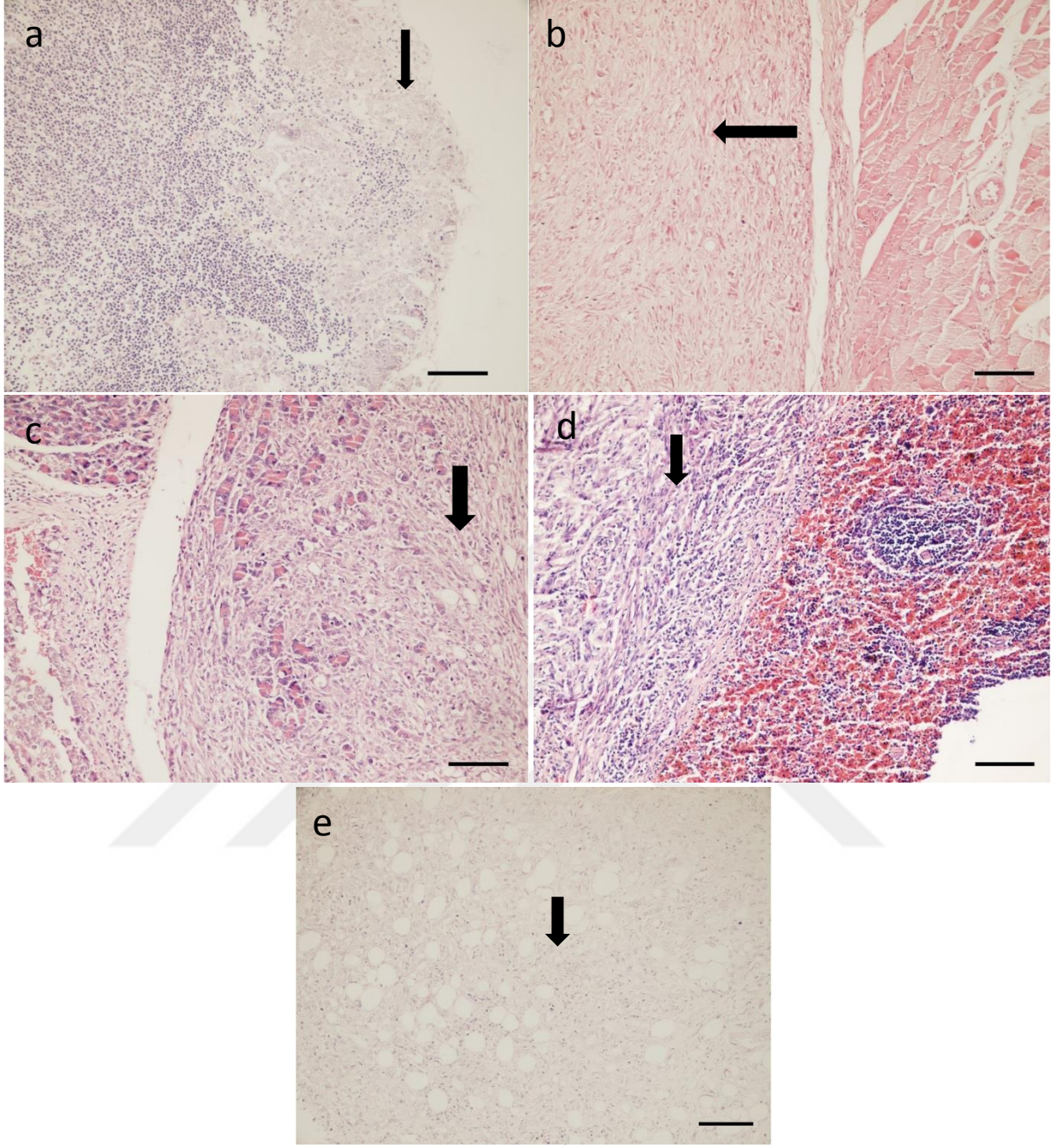
Mikroskopik Bulgular

Pankreaslarına DMBA uygulanan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunun histopatolojik incelemesinde; merkezi nekrotik, sıkışmış duktal yapılar içeren, yer yer kanamalı ve hiperemik, etrafı yoğun bağ doku (dezmozplastik yapı) ve yangı hücreleri ile çevrili alanlara rastlandı (Şekil-5). Bağ doku içerisinde sıkışmış tarzda pankreas bez yapıları ile DMBA kaynaklı kristal yarıklar gözlemlendi. Duktal yapıların azaldığı dikkati çekti. Kanalların epitellerinde sitoplazma ve çekirdek boyutlarında farklılıklar gözlemlendi. Çoğu kanalların tek katlı yapısını kaybedip çok katlı hale geldiği saptandı. Tümöral alanda 40'lık objektifte farklı alanlar incelendiğinde mitoz sayısının yaklaşık 3 ile 5 arasında olduğu dikkati çekti. Düzensiz, dar lümenlere sahip tubuler yapılar gözlemlendi. Tümöral hücrelerin çekirdekleri koyu bazofilik ve veziküler yapıya sahipti. Bezlerin lümenlerinde dökülmüş epitel yapıları dikkati çekti. Bezlerin bazılarının kistleştiği gözlemlendi. Kistik kanalların lümenlerinde salgı ile birlikte nötrofil lökositlere rastlandı. Pankreasın dalağa bağ doku ile adezyonuna DMBA uygulanan sakkaroz grubunda 2, YFMŞ grubunda 3, kontrol grubunda 3 hayvanda gözlemlendi. Pankreasın karaciğer, dalak ve mide serozasına adezyonu DMBA uygulanan kontrol grubundan iki hayvanda dikkati çekti. DMBA uygulanan sakkaroz grubundan tek bir hayvanda dalak kapsülünde fibrozis ve abdominal kas dokusunda granülasyona rastlandı. Tümöral alan içerisinde demir yüklü makrofajlara ve salgı granüllerine rastlandı. DMBA uygulanan diğer hayvanlardan farklı olarak kontrol grubunda tek bir hayvanda; tümöral alanda serbest halde yaygın eritrositler (kanama) ve nekroz dikkati çekti. Çekirdekleri veziküler, sitoplazma ve çekirdek boyutları farklılık gösteren, oval ve yuvarlak hücreler gözlemlendi. Tümöral alanda sarkomatöz değişiklikler dikkati çekti. Tümöral hücreler arasında yer yer tümör tipi dev hücreleri gözlemlendi. Pankreasta gözlenen tümöral hücrelere midenin serozal katmanı, omentum, periton, mezenteriyel lenf yumrusu ve dalakta rastlandı (Şekil-6). Karaciğer ve abdominal kas dokusunda sırayla ayrı olarak DMBA uygulanan YFMŞ grubunda iki hayvanda merkezi nekrotik etrafı bağ doku ve nötrofil lökosit ile çevrili apse odağına rastlandı. Çalışmada elde edilen bulgular ışığında DMBA uygulanan tüm gruplarda tümör oluştuğu saptandı, kontrol grubundaki bir olguda kötü diferensiyasyon dışında diğer tüm olgularda orta diferensiyasyonlu pankreas duktal adenokarsinomu olarak sınıflandırıldı (Tablo-3). DMBA uygulanmayan hayvanlarda pankreaslarına herhangi bir tümöral lezyona rastlanmadı (Şekil-7).



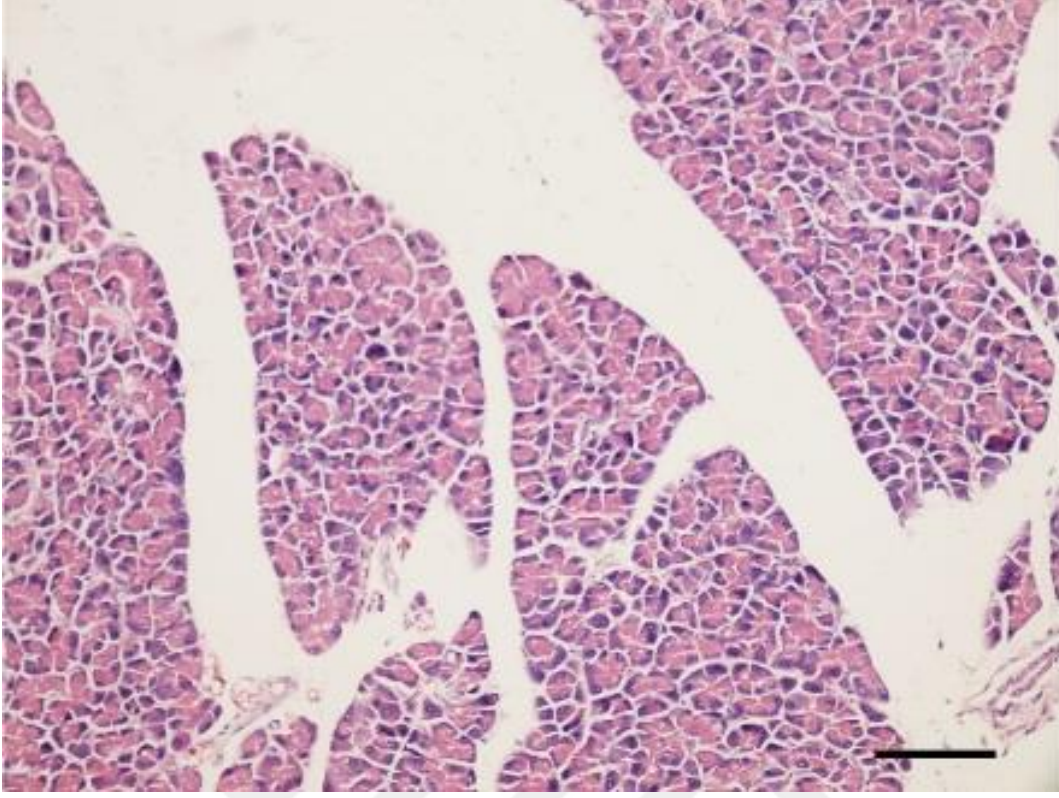
Şekil-5 DMBA uygulanmış YFMS (c), sakkaroz (b) ve kontrol (a) gruplarında mikroskopik görünüm. Yangı hücreleri (ok başı), tubuler kompleks (yıldız), dezmoplastik yapı (ince ok), duktal yapılar. Bar: 100 µm.

YFMS: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen



Şekil-6 DMBA uygulanan kontrol grubunda bir hayvanda gözlenen metastatik anaplastik hücreler (oklar). Mezenteriyel lenf yumrusu (a), periton (b), pankreas (c), dalak (d), omentum (e). Bar: 100 μ m

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen.



Şekil-7 DMBA uygulanmayan sakkaroz grubunda mikroskopik pankreas normal görünümü. Bar: 100 μ m.

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen.

Tablo-3 DMBA uygulanan ve uygulanmayan hayvanlarda gruplara göre PDAK pozitif veya negatif olguları.

Gruplar		PDAK Pozitif	PDAK Negatif
DMBA Uygulanan	YFMŞ	15/15	0/15
	Sakkaroz	16/16	0/16
	Kontrol	15/15	0/15
DMBA Uygulanmayan	YFMŞ	0/5	5/5
	Sakkaroz	0/5	5/5
	Kontrol	0/5	5/5

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, PDAK: Pankreas duktal adenokarsinom, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu

İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal olarak MMP-9 ve MMP-2 primer antikoru ile boyanan pankreas preparatlarının boyandıkları alanlar, gruplara göre boyanma oranları ve şiddeti Tablo-4'te verilmiştir.

MMP-9 Antikoru ile Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamalar

DMBA uygulanan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunda, pankreaslarının tümöral dokularında Langerhans adacıklarının, asiner hücrelerin, tümöral duktal epitellerin, dezmoplazik yapıların ve tubuler komplekslerin bu antikor ile pozitif reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil-8). Pozitif boyanan tümöral kanal epitellerinde intrasitoplazmik ve intranükleer boyanma özelliği dikkati çekti. Yine tüm gruplarda tümöral duktal yapılar ve dezmoplazi çevresinde infiltre olan yangı hücrelerinde (mononükleer hücreler) pozitif reaksiyon gözlemlendi (Tablo-4).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda kontrol grubuna göre Langerhans adacıkları (% 80), asiner hücreler (% 93,3), tümöral duktal epiteller (% 93,3), dezmoplastik yapı (% 86,6) ve tubuler kompleks yapılarında (% 80) yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma gözlemlenmiştir.

DMBA uygulanan sakkaroz grubunda Langerhans adacıkları (%75), asiner hücreler (%87,5), tümöral duktal epiteller (%93,75), dezmoplazik yapı (%93,75) ve tubuler komplekslerde (%68,75) kontrole göre yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma saptandı.

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda sakkaroz grubuna göre Langerhans adacıklarında (%80), asiner hücrelerde (%93,3) ve tubuler kompleks yapılarında (%80) yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma gözlemlendi.

DMBA uygulanan sakkaroz grubunda tümöral duktal epiteller (%93,75), yangı hücreleri (%100) ve dezmoplastik yapılarda (%93,75) YFMŞ'na göre yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma gözlenmiştir.

DMBA uygulanmayan YFMŞ ve kontrol grubunda toplam 15 sıçanda normal Langerhans adacıkları ve asiner hücrelerde pozitif reaksiyon gözlenirken, duktal kanal epitelleri bu boyanma açısından negatifti (Şekil-10, Tablo-5). DMBA uygulanmayan Sakkaroz grubunda asiner hücrelerde pozitiflik mevcutken, Langerhans adacıklarında ve duktal kanal epitellerinde immun boyanmalar negatifti (Tablo-5).

MMP-2 Antikoru ile Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamalar

Bu antikor ile yapılan boyamalarda DMBA uygulanmış YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunda Langerhans adacıklarında, asiner hücrelerde, tümöral duktal epitellerde, dezmoplazik yapı ve tubuler komplekslerde pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil-9, Tablo-4). Dezmoplazik yapı çevresinde gözlenen yangı hücrelerinin (mononükleer hücreler) bu antikor ile boyandıkları dikkati çekti (Tablo-4).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda Langerhans adacıklarında (%80), asiner hücrelerde (%100), tümöral duktal epitellerde (%60), yangı hücrelerinde (%100) ve tubuler komplekslerde (%66,6) kontrole göre yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma gözlemlendi (Tablo-4).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda Langerhans adacıklarında (%80), asiner hücrelerde (%100), tümöral duktal epitellerinde (%60), yangı hücrelerinde (%100), dezmoplastik yapıda (%73,3) ve tubuler komplekslerde (%66,6) sakkarozla göre yüzde olarak daha fazla hayvanda boyanma gözlemlendi.

DMBA uygulanmayan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunda bazı hayvanlarda normal asiner hücrelerde boyanma şiddetine göre soluk düzeyde hafif pozitif reaksiyon

gözlenirken (Şekil-10), duktal kanal epitellerinde ve Langerhans adacıklarında boyanma negatif olarak gözlemlendi (Tablo-5).

Tablo-4 DMBA uygulanan sıçanların pankreaslarında MMP-9 ve MMP-2 pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı.

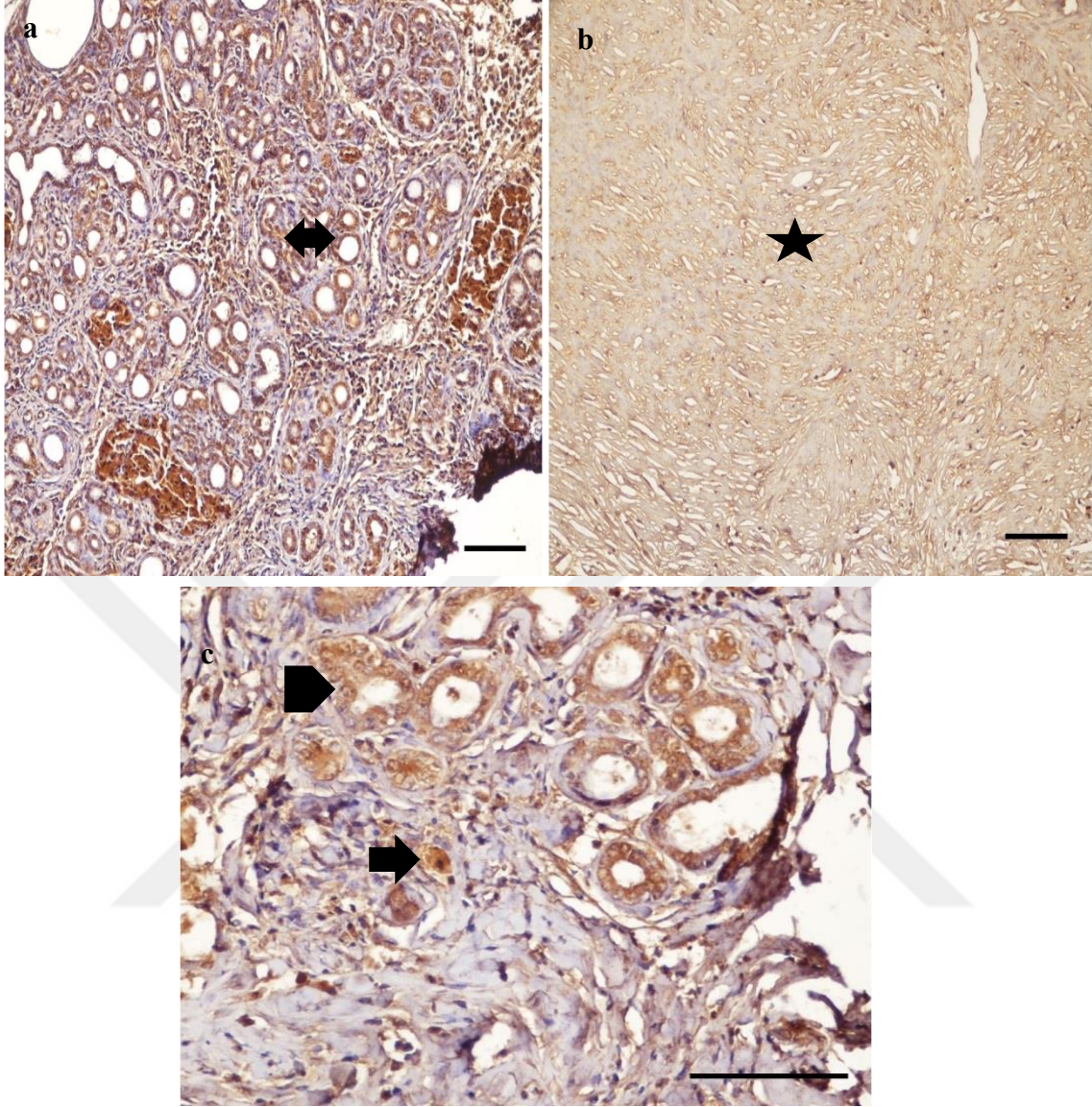
Pankreas	MMP-9			MMP-2		
	YFMŞ (n=15)	Sakkaroz (n=16)	Kontrol (n=15)	YFMŞ (n=15)	Sakkaroz (n=16)	Kontrol (n=15)
Langerhans adacıkları	12/15 (% 80)	12/16 (%75)	9/15 (%60)	12/15 (% 80)	10/16 (%62,5)	10/15 (%66,6)
Asiner hücreler	14/15 (%93,3)	14/16 (%87,5)	9/15 (%60)	15/15 (%100)	12/16 (%75)	13/15 (%86,6)
Tümöral duktal epitel	14/15 (%93,3)	15/16 (%93,75)	12/15 (% 80)	9/15 (%60)	5/16 (%31,25)	8/15 (%53,3)
Yangı hücreleri	13/15 (%86,6)	16/16 (%100)	15/15 (%100)	15/15 (%100)	14/16 (%87,5)	14/15 (%93,3)
Dezmoplazik yapı	13/15 (%86,6)	15/16 (%93,75)	12/15 (%80)	11/15 (%73,3)	7/16 (%43,75)	11/15 (%73,3)
Tubuler kompleks	12/15 (% 80)	11/16 (%68,75)	6/15 (%40)	10/15 (%66,6)	6/16 (%37,5)	6/15 (%40)

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-9: Matriks metalloproteinaz- 9, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.

Tablo-5: DMBA uygulanmayan sıçanların pankreaslarında MMP-9 ve MMP-2 pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı.

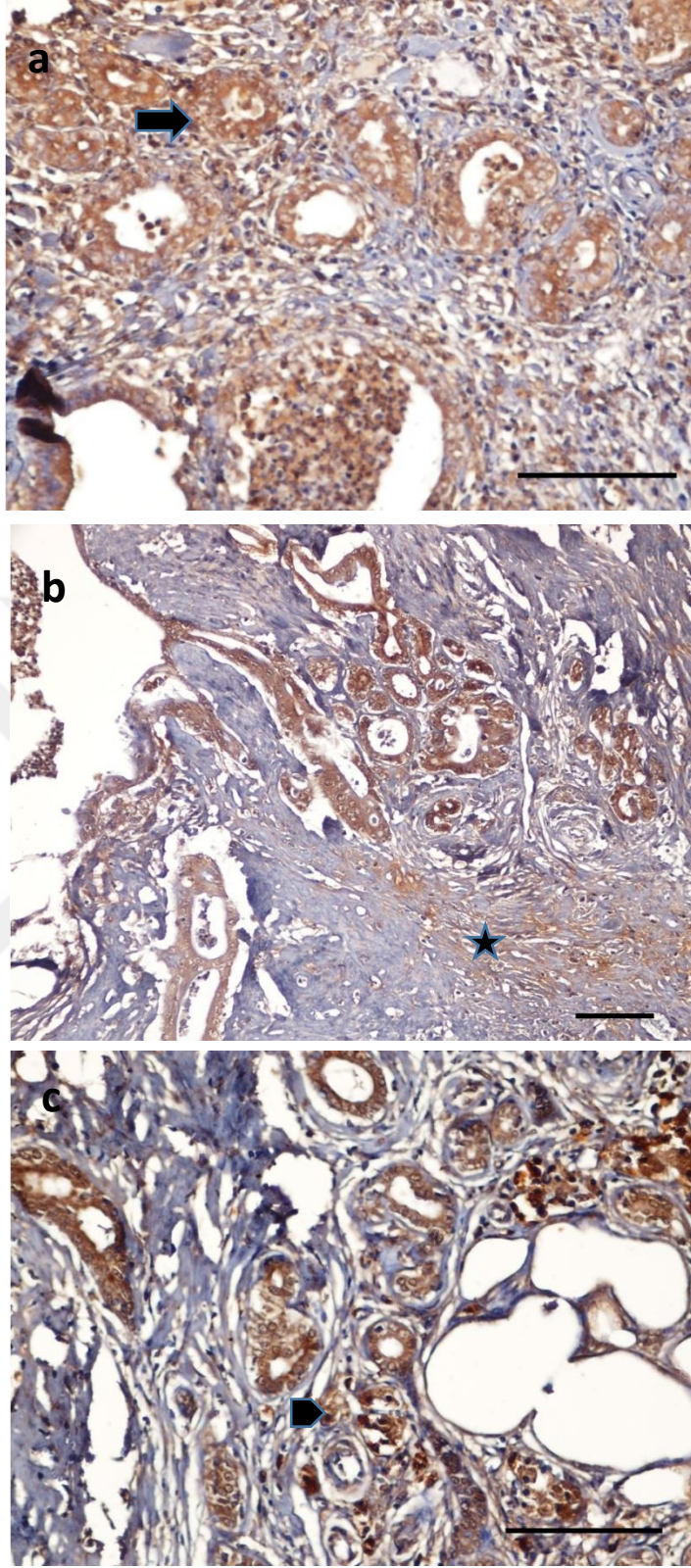
Pankreas	MMP-9			MMP-2		
	YFMŞ (n=5)	Sakkaroz (n=5)	Kontrol (n=5)	YFMŞ (n=5)	Sakkaroz (n=5)	Kontrol (n=5)
Langerhans adacıkları	3/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5
Asiner Hücreler	4/5	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5
Normal Duktal Epiteller	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-9: Matriks metalloproteinaz- 9, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.



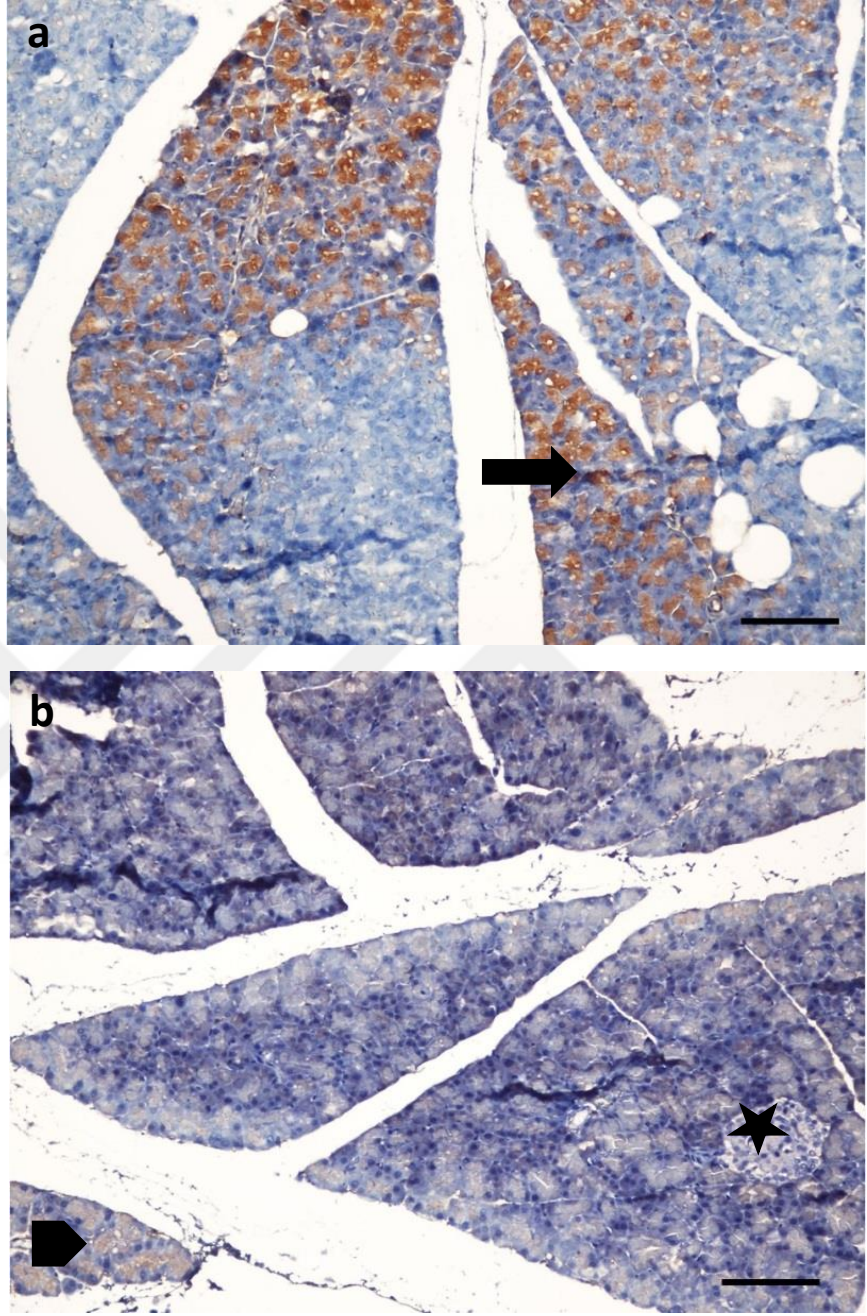
Şekil-8 DMBA uygulanan YFMŞ grubunda MMP-9 enzimi ile boyanan tubuler kompleks (çift taraflı ok, a), dezoplastik yapı (yıldız, b), anaplastik duktal epiteller (ok başı, c), yangı hücresi (kalın ok, c). Bar: 100 µm

YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9.



Şekil-9 DMBA uygulanan YFMS (a), sakkaroz (b), kontrol (c) grubunda MMP-2 pozitif anaplastik duktal epiteller (kalın ok), yangı hücreleri (ok başı) ve dezmozoplazik yapı (yıldız). Bar: 100 µm.

YFMS: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, MMP-2: Matriks



Şekil-10 DMBA uygulanmayan YFMŞ grubunda MMP-9 boyanma (kalın ok, asiner hücreler pozitif, şekil a), MMP-2 boyanma (ok başı; asiner hücreler pozitif, yıldız; Langerhans adacığı negatif, şekil b). Bar: 100 µm

YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.

İmmunohistokimyasal Skorlama Sonuçları

DMBA uygulanmış ve uygulanmamış sıçanların pankreas dokularında yapılan immunohistokimyasal boyamaların istatistiksel değerlendirmeleri tablo-6, 7, 8, 9, 10, 11'de verildi.

DMBA uygulanan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grupları arasında MMP-9 immunohistokimyasal boyamasında, asiner hücreler ($p<0,017$) ve tubuler kompleks yapılarında ($p<0,021$) istatistiksel olarak (Kruskal Wallis, $p<0,05$) anlamlı fark tespit edildi. Anlamlı farklılıklar bulunan grupların ikili karşılaştırılmasında (Mann-Whitney U testi, $p<0,05$) YFMŞ ve kontrol grubunda asiner hücreler ($p<0,015$) ve tubuler kompleks yapılarında ($p<0,011$) sakkaroz ve kontrol grubunda ise asiner hücrelerde ($p<0,024$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo-6, 8).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda MMP-9 boyama açısından, Langerhans adacıklarında, tümöral duktal epitellerin boyanma oranında ve şiddetinde, tubuler komplekslerde DMBA uygulanan kontrol grubuna göre kıyaslandığında ortalama boyanma değeri (medyan değer) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo-6).

DMBA uygulanan sakkaroz grubunda MMP-9 enzimi immunohistokimyasal boyama açısından Langerhans adacıklarında, asiner hücrelerde, duktal epitellerin boyanma oranlarında, tubuler komplekslerde kontrole göre ortalama boyanma değeri yüksek bulundu (Tablo-6).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda MMP-9 enziminin immunohistokimyasal boyama yönünden Langerhans adacıklarının, tümöral duktal epitellerin boyanma oranları ve şiddetleri, dezmoplastik yapıların ve tubuler komplekslerin ortalama boyanma değeri DMBA uygulanan sakkaroz grubuna göre daha yüksek bulundu (Tablo-6).

DMBA uygulanan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubu MMP-2 boyama açısından kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Langerhans adacıklarında ($p<0,012$), asiner hücrelerde ($p<0,003$) ve yangı hücrelerinde ($p<0,009$) anlamlı farka (Kruskal Wallis, $p<0,05$) rastlandı. Anlamlı farklılık bulunan gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında (Mann-Whitney U Testi, $p<0,05$) YFMŞ ve kontrol grubu arasında Langerhans adacıklarında ($p<0,029$) ve yangı hücrelerinde ($p<0,011$) anlamlı farka rastlandı (Tablo-7 ve 9).

DMBA uygulanan YFMŞ grubunda MMP-2 immün boyaması açısından, Langerhans adacıklarında, asiner hücrelerde, tümöral duktal epitellerin boyanma oranları ve şiddetlerinde, yangı hücrelerinde, dezmoplazik yapı ve tubuler komplekslerde sakkaroz ve kontrol grubuna göre ortalama boyanma değeri yüksek bulundu (Tablo-7).

DMBA uygulanmayan YFMŞ grubunda, MMP-9 boyama açısından asiner hücrelerde (%80) kontrol grubuna göre frekans tablosunda daha yüksek oran saptandı (Tablo-10).

DMBA uygulanmayan sakkaroz grubunda, MMP-9 boyama yönünden asiner hücrelerde (%80) kontrol grubuna göre frekans tablosunda daha yüksek oran gözlemlendi (Tablo-10).

DMBA uygulanmayan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol grubunda, MMP-2 boyama yönünden, asiner hücreler, Langerhans adacıkları ve duktal epiteller yönünden frekans tablosunda farklılık gözlemlenmedi (Tablo-11).

Tablo -6 DMBA uygulanan sıçanlarda MMP-9 boyanma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi ($p < 0.05$, Kruskal Wallis testi)

	YFMŞ		Sakkaroz		Kontrol		p
	n	medyan (min-max)	n	medyan (min-max)	n	medyan (min-max)	
Langerhans Adacıkları	15	3(0-4)	16	1,5(0-3)	15	1(0-3)	0,116
Asiner Hücreler	15	1(0-3)	16	1,5(0-3)	15	1(0-2)	0,017
Tümöral Duktal Epitel Boyanma Oranı	13	4(0-4)	14	2(0-4)	14	1,5(0-4)	0,067
Tümöral Duktal Epitel Boyanma Şiddeti	15	3(0-3)	16	2(0-3)	15	2(0-3)	0,562
Yangı Hücreleri	15	2(0-3)	16	2(1-4)	15	2(1-4)	0,790
Dezmoplazik Yapı	15	3(0-4)	16	2(0-4)	15	3(0-4)	0,338
Tubuler Kompleks	15	4(0-4)	16	1(0-4)	15	0(0-4)	0,021

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-9: Matriks metalloproteinaz- 9.

Tablo-7 DMBA uygulanan sıçanlarda MMP-2 boyanma verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (p<0.05, Kruskal Wallis testi)

	YFMŞ		Sakkaroz		Kontrol		p
	n	medyan (min-max)	n	medyan (min-max)	n	medyan (min-max)	
Langerhans Adacıkları	15	2(0-3)	16	1(0-2)	15	1(0-2)	0,012
Asiner Hücreler	15	2(1-3)	16	1(0-3)	15	1(0-3)	0,003
Tümöral Duktal Epitel Boyanma Oranı	15	3(0-4)	14	0(0-4)	14	0,5(0-3)	0,126
Tümöral Duktal Epitel Boyanma Şiddeti	15	3(0-3)	16	0(0-3)	15	1(0-3)	0,167
Yangı Hücreleri	15	3(1-3)	16	1(0-3)	15	1(0-2)	0,009
Dezmoplazik Yapı	15	3(0-4)	16	1(0-3)	15	1(0-3)	0,104
Tubuler Kompleks	15	2(0-4)	16	0(0-4)	15	0(0-3)	0,133

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.

Tablo-8 DMBA uygulanan sıçanlarda MMP-9 boyanmada gruplar arasında farklılık bulunan yapıların istatistiksel değerlendirilmesi (p<0,05, Mann-Whitney U Testi)

Gruplar	Asiner Hücreler	Tubuler Kompleks
YFMŞ-Kontrol	0,015	0,011
Sakkaroz -Kontrol	0,024	0,202

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-9: Matriks metalloproteinaz- 9.

Tablo-9 DMBA uygulanan sıçanlarda MMP-2 boyanmada gruplar arasında farklılık bulunan yapıların istatistiksel değerlendirilmesi (p<0,05, Mann-Whitney U Testi)

Gruplar	Langerhans Adacıkları	Asiner Hücreler	Yangı Hücreleri
YFMŞ-Kontrol	0,029	0,056	0,011
Sakkaroz -Kontrol	0,520	0,101	0,495

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.

Tablo-10 DMBA uygulanmayan sıçanlarda MMP-9 primer antikorunda, gruplar arasında boyanan yapıların frekans tablosu

MMP-9		YFMŞ n(%)	Sakkaroz n(%)	Kontrol n(%)
Langerhans	0	2 (40)	5 (100)	2 (40)
Adacıkları	1	3 (60)	0 (0)	3 (60)
Asiner	0	1 (20)	1 (20)	2 (40)
Hücreler	1	4 (80)	4 (80)	3 (60)
Duktal	0	5 (100)	5 (100)	5 (100)
Epitel	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-9: Matriks metalloproteinaz- 9.

Tablo-11 DMBA uygulanmayan sıçanlarda MMP-2 primer antikorunda, gruplar arasında boyanan yapıların frekans tablosu

MMP-2		YFMŞ n(%)	Sakkaroz n(%)	Kontrol n(%)
Langerhans	0	5 (100)	5 (100)	5 (100)
Adacıkları	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Asiner	0	3 (60)	3 (60)	3 (60)
Hücreler	1	2 (40)	2 (40)	2 (40)
Duktal	0	5 (100)	5 (100)	5 (100)
Epitel	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

DMBA: 7,12 Dimetil Benzantrasen, YFMŞ: Yüksek fruktozlu mısır şurubu, MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Pankreas karsinomlarının % 85-90'lık bölümünü duktal adenokarsinomlar oluşturmaktadır (90). Tez çalışmasına da Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje birimi tarafından desteklenen “UAP(Z)- 2011/65 nolu Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu Tüketiminin Obezite ve Pankreas Kanseri Oluşumuna Etkisinin Araştırılması” başlıklı proje kapsamında sıçanlarda deneysel olarak DMBA implantasyonu ile oluşturulan PDAK tipi tümörler (46 adet) konu olmuştur.

Hayvan modelleri, PDAK'ların genetiğinin ve tümörün gelişim aşamalarının incelenmesine olanak sağlar. Bu çalışma da Sprague Dawley ırkı erkek sıçanlarda, DMBA ile oluşturulan PDAK'larında farklı beslenme modellerinin MMP-9 ve MMP-2 enzimleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışması sırasında DMBA uygulanan tüm sıçanlarda PDAK'ların oluştuğu görülmüştür. İncelenen 45 PDAK olgusunda genel olarak tümör kitlelerinin 0,5-2 cm boyutları arasında olduğu tespit edilmiştir. Bir sıçanda ise meydana gelen PDAK kitlesinin boyutlarının 3 x 4 x 3 cm boyutlarında olduğu gözlenmiştir. Pankreas duktal adenokarsinomlarının kitlesel büyüklükleri ve teşhis sonrası hayatta kalma ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada büyük tümör boyutunun teşhis sonrası sağkalım üzerine olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir. Aynı makalede tümör boyutlarının 2 cm'den daha az olması, lenf yumrularında metastaz olup olmaması pankreas kanserinde önemli prognoz faktörlerdir (91). Sunulan tez çalışmasında gözlenen tümöral kitle boyutları bahsi geçen makale ile uyum içerisindedir.

İnsanlarda pankreas tümörleri ile ilgili olarak erkek bireylerin kadınlara göre daha hassas oldukları (6) bilindiği için tez kapsamında pankreas kanseri oluşturmak amacıyla erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Sprague Dawley ırkı sıçanlar ile yapılan çalışmada yüksek fruktozlu diyetin plazma insülin seviyesini arttırdığını ve glikoz intoleransına yol açtığını bildirmişlerdir (92).

Bazı araştırmalarda fruktoz alımı ve pankreas kanseri arasında ilişkiye rastlanmıştır (93, 94). Fruktoz emilim, sindirim ve metabolizma yönünden glikozdan farklıdır. Fruktoz glikozdan farklı olarak leptin ve insülin sekresyonunu uyarmaz. Vücut ağırlığı ve gıda alımı ile ilgili insülin ve leptin uyarımı önemli olduğu için diyetteki fruktoz artan enerji alımı ve kilo artışına neden olur (95).

Liu ve arkadaşları (96) glikoz ve fruktozun pankreas kanseri hücreleri tarafından farklı metabolize edildiğini bildirmişlerdir. Pankreas kanseri hücreleri artan proliferatif faaliyetlerini kolaylaştırmak için transketolaz metabolizması ile glikoz yerine fruktozu kullanmayı tercih ederler. Bu sebeple pankreatik tümöral hücreler nükleik asit ve nükleotid sentezi için fruktozu kullanır. Ayrıca bu tümöral hücreler fruktozun nükleik asit üretimi için katkısını ürik asit üretimi artışı ile göstermişlerdir. Sunulan tez çalışmasında DMBA ile pankreas kanseri oluşturulan ve YFMŞ deney grubunda anaplastik duktal epitellerin (% 93,3), dezmoplastik yapıların (% 86,6) ve tubuler komplekslerin (% 80) MMP-9 enziminin boyanma yüzdesinin DMBA uygulanan kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yüksek miktarda fruktoz alan grupta MMP-9 enziminin ortalama boyanma değeri anaplastik duktal epitellerde ve tubuler komplekslerde DMBA uygulanan kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. MMP-2 enzimi yönünden bakıldığında DMBA uygulanan YFMŞ grubunda anaplastik duktal epitellerin (% 60) ve tubuler komplekslerin (% 66,6) DMBA uygulanan kontrol grubuna göre boyanma yüzdelerinin fazla olduğu dikkati çekti. DMBA uygulanan YFMŞ grubunda MMP-2 enzim varlığının ortalama boyanma değeri anaplastik duktal epitellerin boyanma oranı ve şiddeti, dezmoplastik yapı ve tubuler komplekslerde DMBA uygulanan kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptandı.

Bazı araştırmacılara göre sakkaroz ile pankreas kanseri arasında bağlantılar ile ilgili çalışmalar mevcuttur (97-100).

Michaud ve arkadaşlarının (93) yaptıkları çalışmaya göre sakkaroz alımı ile pankreas kanseri riski arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunamamıştır. Bu tez çalışmasında DMBA uygulanan sakkaroz ile DMBA uygulanan kontrol gruplarının MMP-9 ve MMP-2 enzimlerinin ortalama boyanma değerleri yönünden karşılaştırıldığında tubuler kompleks, tümöral duktal epitellerin boyanma oranı ve şiddeti, dezmoplastik yapılarında istatistiksel farka rastlanmadı.

Chu ve arkadaşları (101) pankreas kanserlerinde dezmoplazinin ayırıcı özellik olduğunu bildirmişlerdir. Ekstrasellüler matriks, stromal fibroblastlar, yangı hücreleri ve proliferatif endotelial hücreler tümör epitelyal hücrelerinin etrafında birikir (102). Bu tez çalışmasında DMBA ile pankreas kanseri oluşturulan duktal adenokarsinom 46 vakada, yoğun dezmoplastik yapı, yangı hücreleri, anaplastik duktal epiteller gözlemlendi.

Stromal dezmozoplazi içerisinde yer yer sıkışmış, lümeni dar veya kistik anaplastik bez yapıları dikkati çekti. Dezmozoplastik yapıyı çevreleyen yangı hücreleri dikkati çekti.

Pankreatik stellate hücreler (myofibroblastlar) stromanın oluşumunda kritik role sahiptir. Büyüme faktörlerinin aktivasyonunda, pankreasta meydana gelen yangı veya zedelenme sonrasında bu hücreler aktif hale gelerek kollajen ve ekstrasellüler matriksin diğer komponentlerini sentezler. Ayrıca, stellate hücreler pankreas kanserinde kötü vaskularizasyondan sorumludur (103, 104).

Farklı araştırmacılar tarafından sıçan ve fare pankreas dokularına DMBA implantasyonu ve sonrasında pankreas dokusunda pankreatik duktal adenokarsinom geliştiğine dair çalışmalar mevcuttur (20-22, 88, 105-108). Osvaldt ve arkadaşlarının (20) yaptıkları çalışmada DMBA implante edilen bölgelere yakın asiner hücrelerin yerini duktal benzeri hücrelerin oluşturduğu tubuler kompleksler gözlediklerini bildirmişlerdir. Bu alanlarda parenkimde belirgin fibröz stroma görüldüğü bildirilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucu PDAK tanısı konulan 18 vakadan 13 tanesi orta diferensiyel ve 5 tanesi iyi diferensiyel olarak saptanmıştır. Z'Graggen ve arkadaşları (21) ise dezmozoplastik stroma içerisinde düzensiz bezlerin varlığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında literatürlere benzer histopatolojik bulgular gözlemlendi. Mikroskopik sonrası duktal adenokarsinom tanısı konulan pankreas tümörlerinde 45 vaka orta diferensiyel, 1 vaka ise kötü diferensiyel olarak saptandı.

Jimenez ve arkadaşlarının (88) çalışmasında, sıçanların pankreas dokusuna DMBA implantasyonundan 9 ay sonra PDAK meydana gelmiştir. DMBA implantasyonundan 2 hafta ve 1 ay sonra pankreas dokularında mikroskopik incelemede tubuler kompleks yapılarını görmüşlerdir. Rivera ve arkadaşları (106) ise pankreas dokusuna DMBA implantasyonundan 3 ay sonra pankreas dokusunda yangı, duktal hiperplazi, duktal atipi ve duktal displazi görmüşler ve pankreas dokusuna DMBA implantasyondan 6 ay sonra mikroskopik olarak PDAK tanısı bildirilmiştir. Pankreas dokusuna DMBA implantasyonundan 10 ay sonra ise 49 sıçandan 19 tanesinde PDAK tanısı saptamışlardır. Kimura ve arkadaşlarının (107) yaptıkları çalışmada fare pankreas dokularına DMBA implantasyonundan 2 hafta sonrasında 4 hayvanda tubuler kompleksler, 1 ay sonra 5 hayvanda metaplazik lezyonlar, 2 ay sonra 3 hayvanda sarkomatoid adenokarsinom ve 2 hayvanda displastik değişiklikler ve 3 ay sonra 3 hayvanda sarkomatoid ve 2 hayvanda displastik değişikliklere rastladıklarını

bildirmişlerdir. Osvaldt ve arkadaşları (20) fare pankreas dokusuna DMBA implantasyonundan 30 gün sonra 24 fareden 4 tanesinde (%17 oranında) PDAK tanısı konulurken, 60 gün sonra 37 fareden 14 tanesinde (%38 oranında) PDAK tanısı bildirmişlerdir. Dissin ve arkadaşlarının (108) yaptıkları çalışmada sıçanların pankreas dokularına DMBA implantasyonundan sonra 119-363 gün arasında (ortalama 194 günde) sıçanların % 8'inde pankreaslarında tümör geliştiğini, 180 günden daha az zamanda ise 10 hayvanda invazif PDAK geliştiğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında farklı beslenmeye tabi tutulan 10 aylık sıçanların pankreaslarına DMBA implantasyonundan sonra 15 aylık yaşa geldiklerinde yüksek doz genel anestezi altında ötenazileri gerçekleştirildi. Histopatolojik inceleme sonucunda 46 hayvanda pankreas duktal adenokarsinom tanısı konuldu.

Z'graggen ve arkadaşları (21) yaptıkları çalışmada yüksek yağ ve proteinden zengin beslenen sıçanlarda karsinojen implantasyonundan 1 ay sonra, mikroskopik analizde, normal periferik pankreatik doku ve odak şeklinde tubuler kompleks yapılarını çevreleyen merkezi nekrotik alanların varlığını bildirmişlerdir. Ayrıca aşırı yağlı ve proteinden zengin beslenen sıçanlara, implantasyondan 9 ay sonra histolojik inceleme yapıldığında kontrole (normal besleme) göre daha fazla sayıda adenokarsinom vakasına rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, 10 aylık yaşta pankreas dokularına DMBA implante edilen YFMŞ, sakkaroz ve kontrol olarak farklı beslenen tüm gruplarda, 15 aylık yaşta ötenazileri gerçekleştirilen sonra sıçanların mikroskopik ve makroskopik incelemesinde tüm hayvanlarda PDAK meydana geldi. PDAK tanısı konulan tüm gruplarda mikroskopik olarak tubuler kompleks yapıları gözlemlendi.

Jimenez ve arkadaşları (88) implantasyondan 5 ay sonra oluşan tümörlerin 2 cm ve üzerinde olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında makroskopik olarak DMBA uygulanan YFMŞ, sakkaroz ve kontrol gruplarında 0,5-2 cm aralığında, sert, beyazımtırak renkte tümöral kitleler gözlemlendi. Kontrol grubunda bir hayvanda kontakt metastazına bağlı pankreas dokusunda 2 cm'den daha büyük çapta kitleye, komşu organlarda ise 2 cm'den daha küçük kitlelere rastlandı.

Z'graggen ve arkadaşları (21) inceledikleri 49 pankreas adenokarsinomu vakasından 7'sinde makroskopik metastaz gördüklerini, 3 sıçanda lenf yumrusu metastazı ve 4 sıçanda ise peritoneal metastaz varlığını bildirmişlerdir. Jimenez ve arkadaşlarının (88) çalışmasında DMBA ile pankreas kanseri oluşturan olgularda çevre

organlara invazyon ve intraabdominal metastaz görüldüğü bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında 46 duktal adenokarsinom vakasından DMBA uygulanan kontrol grubunda bir hayvanda yaygın peritoneal metastazı ile çevre doku ve organlara metastaz gözlemlendi.

Tan ve Yang (109) sıçanların pankreas dokularına 9 mg DMBA implante etmişlerdir. Bu tez çalışmasında literatüre uygun olarak sıçanların pankreaslarına 9 mg DMBA implante edildi.

İnsanlarda gözlenen pankreatik tümörler, sıçanların tümörleri ile benzer bulgulara sahip olduğu için (106) bu tez çalışmasında sıçanlar kullanılmıştır.

Pankreas kanseri doku örneklerinde farklı araştırmacılar tarafından MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı bildirilmiştir (39, 110). Lekstan ve arkadaşları (111) pankreas kanseri doku örneklerinde MMP-2 enzim konsantrasyonunun ortalama boyanma değerini en yüksek iyi diferensiyasyonlu tipte, en düşük ortalama boyanma değerini ise kötü diferensiyasyonlu tipte saptamışlardır. MMP-9 enzim konsantrasyonu ise ortalama boyanma değerini en yüksek kötü diferensiyasyonlu tipte, en düşük ortalama boyanma değerini ise iyi diferensiyasyonlu vakalarda bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında 46 vakanın 45'i orta diferensiyasyonlu tip duktal adenokarsinomdur.

Gress ve arkadaşlarına (39) göre pankreas adenokarsinom olgularında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı normal pankreas dokusuna göre yüksektir. PDAK olgularında stromal (dezmozoplastik) ve tümöral hücrelerde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı PDAK tanısı konulan YFMS, sakkaroz ve kontrol gruplarında dezmozoplastik yapılar, tubuler kompleks ve tümöral duktal epitellerde immunohistokimyasal olarak boyanma pozitif olarak gözlemlendi.

Lekstan ve arkadaşları (111) pankreas kanseri dokularında MMP-9 ve MMP-2 enzimlerinin varlığını kronik pankreatitis ve normal pankreas olgularına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Tian ve arkadaşlarına (45) göre PDAK tanısı konulan olguların pankreas sıvılarında ve serum örneklerinde immunohistokimyasal boyama ve Western Blot yöntemi ile MMP-9 enzim aktivitesi kronik pankreatitis olgularına göre daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında DMBA ile indüklenen pankreas kanserli vakalarda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı DMBA uygulanmayan gruplara göre immunohistokimyasal olarak daha fazla olduğu görülmüştür.

İki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (46) immunohistokimyasal olarak MMP-2 açısından normal pankreas dokusunda asiner ve islet hücreleri negatiften hafif boyanmaya kadar farklı boyanma özelliği gösterdiği, ancak duktal hücrelerde boyanma olmadığını bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında DMBA uygulanmayan, normal pankreas dokusuna sahip YFMSŞ, sakkaroz ve kontrol gruplarında immunohistokimyasal boyama sonucu asiner hücrelerde hafif şiddette MMP-2 pozitivitesi gözlemlendi. Langerhans adacıkları ve duktal epitellerde boyanmaya rastlanmamıştır.

Pankreas kanserlerinin tanısında diagnostik olarak Karbonhidrat antijen (CA 19-9), Karsinoembriyjenik antijen (CEA) ve karbonhidrat antijen 242 (CA 242) pankreas kanserleri için mevcuttur. Fakat bunlar kombine kullanıldığı takdirde yüksek özgünlüğe sahiptir (23-26). İki ve arkadaşlarının (53) yaptıkları çalışmada, pankreas tümörlerinde MMP-9 ve MMP-2 enzimleri, normal pankreas dokusuna göre mRNA ekspresyonu yüksek bildirilmiştir. PDAK tümörlerinin takibinde serum MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin incelenmesi önemlidir. Serum MMP-9 enzimin varlığı PDAK'ların teşhisinde, metastazında ve prognozunda klinik öneme sahiptir. PDAK'ların kronik pankreatitis ve normal pankreas dokusuna göre serumda MMP-9 enziminin varlığı yüksek bulunmuştur. MMP-9 ve matriks metalloproteinaz inhibitörü TIMP-1 serum pankreas tümörlerinde birlikte kullanıldığı takdirde klasik tümör belirteçlerine (karbonhidrat antijen CA 19-9, karsinoembriyonik antijen CEA) göre prognostik duyarlılığı daha yüksek olduğu bildirilmiştir (54). Bu bilgiler ışığında pankreas tümörü dokularında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin incelenmesi tanıda fayda sağlayabilir.

Tümörle ilişkili makrofajlar ve nötrofiller solid tümörlerde kötü klinik tablo ile ilişkilidir. Tümör ilişkili nötrofiller metastatik tümörün mikro çevresinde baskın olarak MMP-9 salgırlarlar (41). Makrofaj hücreleri ile infiltre pankreas hücreleri farklılaşmaya uğrar. Makrofajlardan salgılanan yangısal sitokinler matriks metalloproteinazlar ile birlikte asiner hücrelerin duktal hücrelere metaplazisine neden olur (47). Bu tez çalışmasında DMBA implante edilen 46 pankreas dokusunda meydana gelen PDAK tümörlerinin mikroskopik incelemesinde dezmoplastik ve anaplastik duktal bezlerin çevresinde makrofaj ve mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Ayrıca DMBA uygulanan YFMSŞ, sakkaroz ve kontrol grubunda gözlenen yangı hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığı immunohistokimyasal olarak saptandı.

Sonuç olarak, daha önce farklı beslenme modellerine sahip Sprague Dawley ırkı erkek sıçanların pankreatik duktal adenokarsinomlarında MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin varlığını inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Glikoz metabolizmasında önemli olan pankreas dokusunun yüksek fruktoz alan gruplardaki tümöral olgularda MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi yönünden daha fazla etkilenmesi, fruktozun kanser hücreleri tarafından daha fazla tercih edilip kullanıldığını ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda früktozun önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Ülkemizde giderek artan hazır gıdaların fazla tüketilmesi, endüstriyel alanda yüksek fruktozlu mısır şurubunun kullanım kolaylığı, daha tatlı olması ve tüketildiği zaman tokluk hissi oluşturmaması nedeniyle bu durum insanlarda giderek obeziteye ve pankreas kanseri riskine neden olabilir. Bu nedenle tüketime sunulan hazır gıdaların yüksek fruktoz içeriklerine dikkat edilmelidir. Ayrıca pankreas duktal adenokarsinom olgularında, teşhis ve invazyon açısından MMP-9 ve MMP-2 enzimlerinin varlığını göstermek, diğer biyokimyasal ve klasik tümör belirteçlerinin yanı sıra daha yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *International Journal of Cancer*, 127: 2893-2917, 2010.
2. ANDERSON KE, MACK TM, SILVERMAN DT. Cancer of the pancreas. Editors: SCHOTTENFELD D, FRAUMENI JF, *Cancer epidemiology and prevention*, Oxford University, New York, page 721-762, 2006.
3. PRASAD SKR, ZENG R. Epidemiology and genetics of pancreatic cancer. Editor: REZNEK RH, HEIKEN JP. *Pancreatic cancer*, Cambridge University Press, New York, page 1-2, 2009.
4. PARTENSKY C. Epidemiology of pancreatic adenocarcinomas. *La Revue Du Praticien*, 65: 364-366, 369-370, 2015.
5. MITCHELL RN, KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Pocket companion to Robbins and Cotran pathologic basis of disease (Robbins ve Cotran hastalığın patolojik temeli cep kitabı). Çeviren: ÖZDAMAR ŞO, 7.baskı, Güneş tıp kitabevi, Ankara, sayfa 480-481, 2008.
6. SAFALI M. Pankreas patolojisi. Editörler: KUZEY GM, ÖZDAMAR ŞO, ZENGEROĞLU S. *Temel patoloji*, 1.baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, sayfa 523-524, 2007.
7. KLOPPEL G, KLIMSTRA DS. Tumors of the exocrine pancreas. Editor: FLETCHER CDM. *Diagnostic histopathology of tumors*, 3th edition, Elsevier, China, page 463-470, 2007.
8. ROSAI J. Pancreas and Ampullar Region. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*, 9th edition, Elsevier, China, page 1061-1073, 2004.
9. MALATS N, PORTA M, COROMINAS JM, PINOL JL, RIFA J, REAL FX. K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. Pank-ras I project investigators. *International Journal of Cancer*, 70: 661-667, 1997.
10. LAUNSTEIN TC, MARTIN DR, SARMIENTO JM, KALB B, MOREIRA R, CAREW J, SALMAN K, ADSAY V. Pancreatic adenocarcinoma tumor grade determination using contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pancreas*, 39: 71-75, 2010.
11. SHIRAI Y, OHTANI T, TSUKADA K, HATAKEYEMA K. Patterns of lymphatic spread of carcinoma of the ampulla of Vater. *British Journal of Surgery*, 84: 1012-1016, 1997.
12. KAYAHARA M, NAGAKAWA T, UENO K, OHTA T, TSUKIOAKA Y, MIYAZAKI I. Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head area based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion. *Surgery*, 117: 616-623, 1995.
13. DOGUSOY GB. Pankreas karsinomu patolojisi. Türkiye kanserle savaş vakfı, onkolojide güncel yaklaşım toplantıları, pankreas kanseri, İstanbul, sayfa 5-9, 2011.
14. HAMILTON SR, AALTONEN LA. Tumours of the exocrine pancreas. *World Health Organization Classification of Tumours*. IARC press, Lyon, page 221-230, 2000.
15. ADSAY NV, BASTURK O, BONNETT M, KILINC N, ANDEA AA, FENG J, CHE M, AULICINO MR, LEVI E, CHENG JD. A proposal for a new and more

- practical grading scheme for pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 29: 724-733, 2005.
16. BOSMAN FT. World Health Organization classification of tumours the digestive system. Editors: CARNEIRO F, HRUBAN RH, THEISE ND. World Health Organization International Agency For Research Cancer, volume 3, 4th edition, IARC Press, Lyon, page 280-289, 2010.
 17. RAMAKRISHNA NV, DEVANESAN PD, ROGAN EG, CAVALIERI EL, JEONG H, JANKOWIAK R, SMALL GJ. Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenzanthracene. *Chemical Research Toxicology*, 5: 220-226, 1992.
 18. ZHU Z, LIU T, HAN F, ZHAN SD, WANG CY. Mutations in the p16 gene in DMBA –induced pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer in rats. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, 14: 208-214, 2015.
 19. LI D, JIAO L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 33: 3-14, 2003.
 20. OSVALDT AB, WENDT LR, BERSCH VP, BACKES AN, DE CASSIA A SCHAUMER C, EDELWEISS MI, ROHDE L. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery*, 140: 803-809, 2006.
 21. Z'GRAGGEN K, WARSHAW AL, WERNER J, GRAEME-COOK F, JIMENEZ RE, FERNANDEZ-DEL CASTILLO F. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA induced ductal pancreatic cancer in rats. *Annals of Surgery*, 233: 688-695, 2001.
 22. WENDT LR, OSVALDT AB, BERSCH VP, SCHUMACHER RDE C, EDELWEISS MI, ROHDE L. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. Effects of alcohol and caffeine. *Acta Cirurgica Brasileria*, 22: 202-209, 2007.
 23. NI XG, BAI XF, MAO YL, SHAO YF, WU JX, SHAN Y, WANG CF, WANG J, TIAN YT, LIU Q, XU DK, ZHAO P. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgery Oncology*, 31: 164-169, 2005.
 24. HAGLUND C, ROBERTS PJ, KUUSELA P, SCHEININ TM, MAKELA O, JALANKO H. Evaluation of CA 19-9 as a serum tumour marker in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 53: 197-202, 1986.
 25. HAGLUND C, LINDGREN J, ROBERTS PJ, KUUSELA P, NORDLING S. Tissue expression of the tumour associated antigen CA242 in benign and malignant pancreatic lesions. A comparison with CA 50 and CA 19-9. *British Journal of Cancer*, 60: 845-851, 1989.
 26. HAGLUND C, LUNDIN J, KUUSELA P, ROBERTS PJ. CA 242, a new tumour marker for pancreatic cancer: a comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA. *British Journal of Cancer*, 70: 487-492, 1994.
 27. PHILLIPS PA, MCCARROLL JA, PARK S, WU MJ, PIROLA R, KORSTEN M, WILSON JS, APTE MV. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*, 52: 275-282, 2003.
 28. BINKLEY CE, ZHANG L, GREENSON JK, GIORDANO TJ, KUICK R, MISEK D, HANASH S, LOGSDON CD, SIMEONE DM. The molecular basis of pancreatic fibrosis: common stromal gene expression in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 29: 254-263, 2004.

29. KELEG S, BUCHLER P, LUDWING R, BUCHLER MW, FRIESS H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2: 14, 2003.
30. BLOOMSTON M, SHAFII A, ZERVOS EE, ROJANI A, ROSEMURGY AS. MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. *Journal of Surgical Research*, 102: 35-38, 2002.
31. EL-GHLBAN S, KASAI T, SHIGEHIRO T, YIN HX, SEKHAR S, IDA M, SANCHEZ A, MIZUTANI A, KUDOH T, MURAKAMI H, SENO M. Chlorotoxin–Fc fusion inhibits release of MMP-2 from pancreatic cancer cells. *Biomed Research International*, 2014: 152659, 2014.
32. ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, YOSHIOKA T, NISHIMOTO H, ITOHARA S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Research*, 58: 1048-1051, 1998.
33. STETLER-STEVENSON WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation*, 103: 1237-1241, 1999.
34. ALLGAYER H, BABIC R, BEYER BC, GRUTZNER KU, TARABICHI A, SCHILDBERG FW, HEISS MM. Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. *Oncology*, 55: 152-160, 1998.
35. TALVENSAAARI-MATTILA A, PAAKKO P, TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *British Journal of Cancer*, 89: 1270-1275, 2003.
36. LEPPA S, SAARTO T, VEHMANEN L, BLOMQVIST C, ELOMAA I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10: 1057-1063, 2004.
37. TORNG PL, MAO TL, CHAN WY, HUANG SC, LIN CT. Prognostic significance of stromal metalloproteinase-2 in ovarian adenocarcinoma and its relation to carcinoma progression. *Gynecologic Oncology*, 92: 559-567, 2004.
38. BRAMHALL SR, NEOPTOLEMOS JP, STAMP GW, LEMOINE NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *Journal of Pathology*, 182: 347-355, 1997.
39. GRESS TM, MULLER-PILLASCH F, LERCH MM, FRIESS H, BUCHLER M, ADLER G. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 62: 407-413, 1995.
40. MAATTA M, SOINI Y, LIAKKA A, AUTIO-HARMAINEN H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, (MMP)-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clinical Cancer Research*, 6: 2726-2734, 2000.
41. BENSON DD, MENG X, FULLERTON DA, MOORE EE, LEE JH, AO L, SILLIMAN CC, BARNETT CC JR. Activation state of stromal inflammatory cells in murine metastatic pancreatic adenocarcinoma. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302: R1067-1075, 2012.
42. SOYDİNÇ HO, ÇAMLICA H, DURANYILMAZ D, SAĞLAM EK, TAŞ F, YASASEVER V, DALAY N. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 21: 53–56, 2006.
43. APAKKAN AKSUN S, BAYINDIR O, ÖZMEN D. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 21: 332–342, 2001.

44. MCCAWLEY LJ, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Current Opinion In Cell Biology*, 13: 534-540, 2001.
45. TIAN M, CUI YZ, SONG GH, ZONG MJ, ZHOU XY, CHEN Y, HAN JX. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*, 8: 241, 2008.
46. IKI K, TSUTSUMI M, KIDO A, SAKITANI H, TAKAHAMA M, YOSHIMOTO M, MOTOYAMA M, TATSUMI K, TSUNODA T, KONISHI Y. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) membrane type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Carcinogenesis*, 20: 1323-1329, 1999.
47. LIU GY, DOPPLER H, NECELA B, KRISHNA M, CRAWFORD HC, RAIMONDO M, STORZ P. Macrophage secreted cytokines drive pancreatic acinar to ductal metaplasia through NF-KB and MMPS. *The Journal of Cell Biology*, 202: 563-577, 2013.
48. SULLU Y, DEMIRAG GG, YILDIRIM A, KARAGOZ F, KANDEMIR B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathology, Research and Practice*, 207: 747-753, 2011.
49. JONES LE, HUMPHREYS MJ, CAMPBELL F, NEOPTOLEMOS JP, BOYD MT. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: Increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clinical Cancer Research*, 10: 2832-2845, 2004.
50. ELLENRIEDER V, ALBER B, LACHER U, HENDLER SF, MENKE A, BOECK W, WAGNER M, WILDA M, FRIESS H, BUCHLER M, ADLER G, GRESS TM. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *International Journal of Cancer*, 85: 14-20, 2000.
51. LAACK E, KOHLER A, KUGLER C, DIERLAMM T, KNUFFMANN C, VOHWINKEL G, NIESTROY A, DAHLMANN N, PETERS A, BERGER J, FIEDLER W, HOSSFELD DK. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 13: 1550-1557, 2002.
52. YANG SF, HSIEH YS, LIN CL, HSU NY, CHIOU HL, CHOU FP, CHU SC. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 354: 91-99, 2005.
53. IKI K, TAKEO T, KUBOZOE T, AOKI S, HAYASHI J, TSUNODA T. Detection of serum MMPs in tumor-bearing hamsters. *Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery*, 9: 478-484, 2002.
54. MROCZKO B, LUKASZEWICZ ZAJAC M, WERESZCZYNSKA SIEMIATKOWSKA U, GROBLEWSKA M, GRYKO M, KEDRA B, JURKOWSKA G, SZMITKOWSKI M. Clinical significance of the measurements of serum matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) in patients with pancreatic cancer. *Pancreas Journal*, 38: 613-618, 2009.
55. SLACK JM. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121: 1569-1580, 1995.
56. SUCKOW MA, WEISBROTH SH, FRANKLIN CL. *The laboratory rat*, 2th edition. Elsevier Academic Press, California, page 105, 2006.

57. KARA ME. The anatomical study on the rat pancreas and its ducts with emphasis on the surgical approach. *Annals of Anatomy*, 187: 105-112, 2005.
58. STINSON AW, CALHOUN ML. Digestive system. Editor: DELLMANN HD, *Textbook of veterinary histology*, 4th edition, Williams Wilkins Press, USA, page 191, 1992.
59. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO. *Basic histology*, 8th edition, Appleton Lange Press, America, page 303-305, 1995.
60. POUR PM, PANDEY KK, BATRA SK. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma?. *Molecular Cancer*, 2: 1-10, 2003
61. ÖZER A, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ERDOST H, ZİK B. *Histoloji kılavuzu*, 2. baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü, Bursa, sayfa 132, 2006.
62. MAXIE MG. *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*, volume 2, 5th edition, Saunders Elsevier, London, page 389-423, 2007.
63. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu-1.pdf (Giriş Tarihi: 30.04.2015)
64. JANSEN RJ, TAN XL, PETERSEN GM. Gene-by environment interactions in pancreatic cancer: implications for prevention. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 88: 115-126, 2015.
65. MORRIS J, DOBSON J. *Small animal oncology*, 1th edition, Blackwell Science, London, page 140-142, 2001.
66. MEUTEN JD. *Tudom, tumors in domestic animals*, 4th edition, Iowa State Press, Iowa, page 478-481, 2002.
67. LI W, MA Q, LI J, GUO K, LIU H, HAN L, MA G. Hyperglycemia enhances the invasive and migratory activity of pancreatic cancer cells via hydrogen peroxide. *Oncology Reports*, 25: 1279,1287, 2011.
68. RINDI G, FALCONI M, KLERSY C, ALBARELLO L, BONINSEGNA L, BUCHLER MW, CAPELLA C, CAPLIN M, COUVELARD A, DOGLIONI C, DELLE FAVE G, FISCHER L, FUSAI G, DE HERDER WW, JANN H, KOMMINOTH P, DE KRIJGER RR, LA ROSA S, LUONG TV, PAPE U, PERREN A, RUSZNIEWSKI P, SCARPA A, SCHMITT A, SOLCIA E, WIEDENMANN B. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *Journal of National Cancer Institute*, 104: 764-777, 2012.
69. RINDI G, KLOPPEL G, ALHMAN H, CAPLIN M, COUVELARD A, DE HERDER WW, ERIKSSON B, FALCHETTI A, FALCONI M, KOMMINOTH P, KORNER M, LOPES JM, MCNICOL AM, NILSSON O, PERREN A, SCARPA A, SCOAZEC JY, WIEDENMANN B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*, 449: 395-401, 2006.
70. STEINBERG WM, GELFAND R, ANDERSON KK, GLENN J, KURTZMAN SH, SINDELAR WF, TOSKES PP. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology*, 90: 343-349, 1986.
71. BALLEHANINNA UK, CHAMBERLAIN RS. Serum CA 19-9 as a biomarker for pancreatic cancer a comprehensive review. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 2: 88-100, 2011.
72. HALM U, SCHUMANN T, SCHIEFKE I, WITZIGMANN H, MOSSNER J, KEIM V. Decrease of CA 19-9 during chemotherapy with gemcitabine predicts

- survival time in patients with advanced pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 82: 1013-1016, 2000.
73. KIM J, LEE YS, HWANG IK, KANG BK, CHO JY, YOON YS, HAN HS, HWANG JH. Postoperative carcinoembryonic antigen as a complementary tumor marker of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Korean Medical Science*, 30: 259-263, 2015.
 74. DEWITT J, DEVEREAUX BM, LEHMAN GA, SHERMAN S, IMPERIALE TF. Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4: 717-725, 2006.
 75. MULLER MF, MEYENBERGER C, BERTSCHINGER P, SCHAER R, MARINCEK B. Pancreatic tumours: evaluation with endoscopic US, CT and MR imaging. *Radiology*, 190: 745-751, 1994.
 76. PEREK S. Pankreas kanseri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi, no: 28, sayfa 215-230, 2002.
 77. İMREN HY. Kedi ve köpek hastalıkları, 1. baskı, Medisan Yayınları, sayfa 103, 1998.
 78. NAGASE H, WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 21491–21494, 1999.
 79. VARANI J, HATTORI Y, CHI Y, SCHMIDT T, PERONE P, ZEIGLER ME, FADER DJ, JOHNSON TM. Collagelytic and jelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *British Journal of Cancer*, 82: 657–665, 2000.
 80. GONZALEZ LO, CORTE MD, VAZQUEZ J, JUNQUERA S, SANCHEZ R, VINA A, RODRIGUEZ JC, LAMELAS ML, VIZOSO F. Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology*, 53: 403–415, 2008.
 81. HUANG J, ANG L, LIU MQ, HU HG, WANG J, ZOU Q, ZHAO Y, ZHENG L, ZHAO M, WU ZS. Serum and tissue expression of gelatinase and Twist in breast cancer. *European Review For Medical and Pharmacological Sciences*, 18: 2662-2669, 2014.
 82. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 48: 1014-1022, 1962.
 83. SMIGIELSKI J, PISKORZ L, TALAR-WOJNAROWSKA R, MALECKA-PANAS E, JABLONSKI S, BROCKI M. The estimation of metalloproteinases and their inhibitors blood levels in patients with pancreatic tumors. *World Journal of Surgical Oncology*, 11: 137, 2013.
 84. KUITTINEN O, SAVOLAINEN ER, KOISTINEN P, TURPEENNIEMI H, HUIJANEN T. Gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9) in leukaemia MMP-2 may indicate a good prognosis in AML. *Anticancer Research*, 19: 4395–4400, 1999.
 85. SOINI Y, ALARAKKOLA E, AUTIO-HARMAINEN H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Human Pathology*, 28: 220-226, 1997.
 86. IURLARO M, LOVERRO G, VACCA A, CORMIO G, RIBATTI D, MINISCHETTI M, RIA R, BRUNO M, SELVAGI L. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and

- myometrial invasion in endometrial carcinoma. *European Journal of Clinical Investigation*, 29: 793-801, 1999.
87. MATOS LL, TRUFELLI DC, DE MATOS MG, DA SILVA PINHAL MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker Insights*, 5: 9-20, 2010.
 88. JIMENEZ RE, Z'GRAGGEN K, HARTWIG W, GRAEME-COOK F, WARSHAW AL, FERNANDEZ DEL CASTILLO C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *American Journal of Pathology*, 154: 1223-1229, 1999.
 89. FREITAS S, MEDURI G, LE NESTOUR E, BAUSERO P, PERROT APPLANAT M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biology of reproduction*, 61: 1070-1082, 1999.
 90. RIENER MO, PILARSKY C, GERHARDT J, GRUTZMANN R, FRITZSCHE FR, BAHRA M, WEICHERT W, KRISTIANSEN G. Prognostic significance of AGR2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Histology and Histopathology*, 24: 1121-1128, 2009.
 91. GARCEA G, DENNISON AR, PATTENDEN CJ, NEAL CP, SUTTON CD, BERRY DP. Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *Journal of Pancreas*, 9: 99-132, 2008.
 92. HUANG BW, CHIANG MT, YAO HT, CHIANG W. The effect of high-fat and high fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 6: 120-126, 2004.
 93. MICHAUD DS, LIU S, GIOVANNUCCI E, WILLETT WC, COLDITZ GA, FUCHS CS. Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *Journal of National Cancer Institute*, 94: 1293-1300, 2002.
 94. NOTHLINGS U, MURPHY SP, WILKENS LR, HENDERSON BE, KOLONEL LN. Dietary glycemic load, added sugars, and carbohydrates as risk factors for pancreatic cancer: The multiethnic cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86: 1495-1501, 2007.
 95. BRAY GA, NIELSEN SJ, POPKINBM. Consumption of high fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 537-543, 2004.
 96. LIU H, HUANG D, MCARTHUR DL, BOROS LG, NISSEN N, HEANEY AP. Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer Research*, 70: 6368-6376, 2010.
 97. SILVERA SA, ROHAN TE, JAIN M, TERRY PD, HOWE GR, MILLER AB. Glycemic index, glycemic load, and pancreatic cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control*, 16: 431-436, 2005.
 98. AUNE D, CHAN DS, VIEIRA AR, NAVARRO ROSENBLATT DA, VIEIRA R, GREENWOOD DC, CADE JE, BURLEY VJ, NORAT T. Dietary fructose, carbohydrates, glycemic indices and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*, 23: 2536-2546, 2012.
 99. SAKAMOTO A, GOYA M, DEGAWA Y, MITSUI M, MORI T, TAMURA K, TSUTSUMI M. Promoting effects of sucrose rich diet on N-Nitrosobis (2-oxopropyl) amine-induced Pancreatic Carcinogenesis in Hamsters. *Journal of Toxicologic Pathology*, 23: 19-24, 2010.
 100. STOLZENBERG-SOLOMON RZ, PIETINEN P, TAYLOR PR, VIRTAMO J, ALBANES D. Stolzenberg-Solomon et al. respond to "What do we know about

- pancreas cancer? ” by Potter. *American Journal of Epidemiology*. 155: 796–797, 2002.
101. CHU GC, KIMMELMAN AC, HEZEL AF, DEPINHO RA. Stromal biology of pancreatic cancer. *Journal Cellular Biochemistry*, 101: 887-907, 2007.
 102. HRUBAN RH, ADSAY NV, ALBORES SAAVEDRA J, COMPTON C, GARRETT ES, GOODMAN SN, KERN SE, KLIMSTRA DS, KLOPPEL G, LONGNECKER DS, LUTTGES J, OFFERHAUS GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *American Journal of Surgical Pathology*. 25: 579–586, 2001.
 103. HIDALGO M. Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 362: 1605-1617, 2010.
 104. MASAMUNE A, SHIMOSEGAWA T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *Journal of Gastroenterology*, 44: 249-260, 2009.
 105. BOCKMAN DE, BLACK O JR, MILLS LR, WEBSTER PD. Origin of tubular complexes during induction of pancreatic adenocarcinoma by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *The American Journal of Pathology*, 90: 645-658, 1978.
 106. RIVERA JA, GRAEME-COOK F, WERNER J, Z'GRAGGEN K, RUSTGI AK, RATTNER DW, WARSHAW AL, FERNANDEZ-DEL CASTILLO C. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery*. 122: 82–90, 1997.
 107. KIMURA K, SATOH K, KANNO A, HAMADA S, HIROTA M, ENDOH M, MASAMUNE A, SHIMOSEGAWA T. Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Science*, 98: 155-162, 2007.
 108. DISSIN J, MILLS LR, MAINS DL, BLACK O JR, WEBSTER PD 3RD. Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. *Journal of The Cancer Institute*, 55: 857-864, 1975.
 109. TAN XG, YANG ZL. Expression of Ezrin, HGF, C-met in pancreatic cancer and non-cancerous pancreatic tissues of rats. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*, 9: 639-644, 2010.
 110. SATOH K, OHTANI H, SHIMOSEGAWA T, KOIZUMI M, SAWAI T, TOYOTA T. Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology*, 107: 1488-1495, 1994.
 111. LEKSTAN A, LAMPE P, LEWIN-KOWALIK J, OLAKOWSKI M, JABLONSKA B, LABUZEK K, JEDRZEJOWSKA-SZYPULKA H, OLAKOWSKA E, GORKA D, FILIP I, DRANKA-BOJAROWSKA D. Concentrations and activities of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors (TIMPS) in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63: 589-599, 2012.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca akademik bilgilerini benimle paylaşan, doktora tezimin konusunun belirlenmesi, planlanması, sonuçlandırılması aşamalarında yanımda olan eski danışman hocam Prof. Dr. Gürsel SÖNMEZ'e ve eski danışman hocamın yurt dışında olması nedeniyle yerine görevlendirilen yeni danışman hocam Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ'a teşekkür ederim. Doktora eğitimi sırasında emekleri olan Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN'a, Doç. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT'e, Yard. Doç. Dr. İ.Taci CANGÜL'e, Yard. Doç. Dr. Aylin ALASONYALILAR DEMİRER'e ve çalışma arkadaşım Araş. Gör. Volkan İPEK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez savunma sınavıma gelerek tez ile ilgili tavsiye ve bilgilerini sunan sayın hocalarım Doç. Dr. Alper SEVİMLİ'ye ve Doç. Dr. Funda YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan U.Ü. Araştırma Fonu Başkanlığına ve istatistik hesaplarının yapılmasında yardımcı olan U.Ü. Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında çalışan Araş.Gör. Ender Çarkungöz Uzabacı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Akademik ilerlememde her türlü desteklerini benden esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan canım annem Dilek İNAN'a, canım babam Sıtkı İNAN'a, canım abim Emre İNAN'a, hayat sevincim canım oğlum Oğuzhan'a, dostum Gözde Coşkunserçe'ye, dayıcım Emre Aküren'e ve canım ablam Gülsüm Özyiğit'e teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Bursa'da doğdum. Babamın mesleğinden dolayı ve tayin görmesi sebebiyle eğitim- öğretim hayatımı çeşitli okullarda geçirdim. İlkokul 1. sınıf İzmir Salih İş Gören İlkokulu, ilkokul 2.sınıftan 5'e kadar Bartın Cumhuriyet İlkokulunu bitirdim. İlkokul 5. sınıfta anadolu lisesi sınavlarımı kazanarak Bartın Anadolu Lisesi'ne, hazırlık sınıfı olarak başladım. Ortaokul 1 ve 2.sınıf Çanakkale Milli Piyango Anadolu Lisesi, ortaokul 3 ve lise 1,2,3 Ankara Polatlı Anadolu Lisesini bitirdim. Üniversite sınavlarına girerek Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim. İki aşamalı yabancı dil muaf sınavını kazanarak üniversite hazırlık sınıfını okumadan direk 1.sınıfa geçtim. 2009 yılında Veteriner Fakültesi'ni birincilikle bitirdikten sonra, aynı yıl fakültenin Patoloji Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. 2011 yılında araştırma görevlisi olarak atandım. Bir erkek çocuğa sahibim.