

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Patoloji Anabilim Dalı

**KRONİK KARACİĞER HASTALIĞINDA FİBROGENEZİS SÜRECİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL PARAMETRELER
(TGF-B1, FSP1-S100A4, α -DÜZ KAS AKTİNİ, KOLLAGEN TİP 1 VE
E-KADERİN) EŞLİĞİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğba Karadeniz

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semin AYHAN

Manisa, 2012

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Patoloji Anabilim Dalı

**KRONİK KARACİĞER HASTALIĞINDA FİBROGENEZİS SÜRECİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL PARAMETRELER
(TGF-B1, FSP1-S100A4, α -DÜZ KAS AKTİNİ, KOLLAGEN TİP 1 VE
E-KADERİN) EŞLİĞİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğba Karadeniz

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semin AYHAN

Manisa, 2012

Anabilim dalımızda asistanlık eğitimim süresince ve tez hazırlığım boyunca bilgilerini benimle paylaşan, desteğini benden esirgemeyen, beni yüreklendiren ve bana cesaret veren tez hocam Prof. Dr. Semin Ayhan'a, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve sık sık yaptığı motivasyonlarla katkılarını asla unutmayacağım sayın hocalarım Prof. Dr. Aydın İşisağ'a, Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na, Doç. Dr. Peyker Temiz'e ve Doç. Dr. Nalan Neşe'ye, bilim dalımızda çalışmış ve halen çalışmakta olan değerli arkadaşlarım Fazilet Uğur Duman, Sevcan Balcı ve Ayşegül Bayrakçı'ya, patoloji laboratuvarımızda görevli tüm teknisyen ve arşiv görevlisi arkadaşlarıma, hayattaki en büyük destekçilerim olan aileme ve benim için her zaman en iyiyi isteyen, sevgi ve desteğini sunan sevgili eşime, varlığıyla bana güç veren canım oğluma teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuğba Karadeniz

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER	
1. Karaciğerin histolojisi	2
2. Karaciğer biopsilerine genel yaklaşım.....	4
3. Karaciğer biopsilerinde uygulanan histokimyasal ve immunohistokimyasal boyalar.....	5
4. Karaciğer hasarında görülen elementer lezyonlar.....	6
5. Kronik hepatit nedenleri ve morfolojik bulgular.....	9
6. Kronik hepatitlerde Ishak skorlaması.....	13
7. Fibrogenesis mekanizmaları.....	17
8. Transforming Growth Factor- β ve fibrogenizisteki rolü.....	22
9. Epiteliyal mezenkimal dönüşüm.....	25
10.. α - Düz Kas Aktini	29
11. Fibroblast Spesifik Faktör-S100A4	29
12. Kollagen tip-I	29
13. E-Kaderin	30
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
IV. BULGULAR.....	40
V. TARTIŞMA.....	66
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77

VII. ÖZET.....	80
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	81
IX. KAYNAKLAR.....	82

KISALTMALAR

EMT.....	Epitelial mezenkimal dönüşüm
ESM.....	Ekstrasellüler matriks
FSP-S10A4A4.....	Fibroblast Spesifik Protein-S100A4
HAI.....	Histolojik aktivite indeksi
HSH.....	Hepatik stellat hücre
IHK.....	İmmunohistokimya
TGF-β.....	Transforming Growth Factor-beta

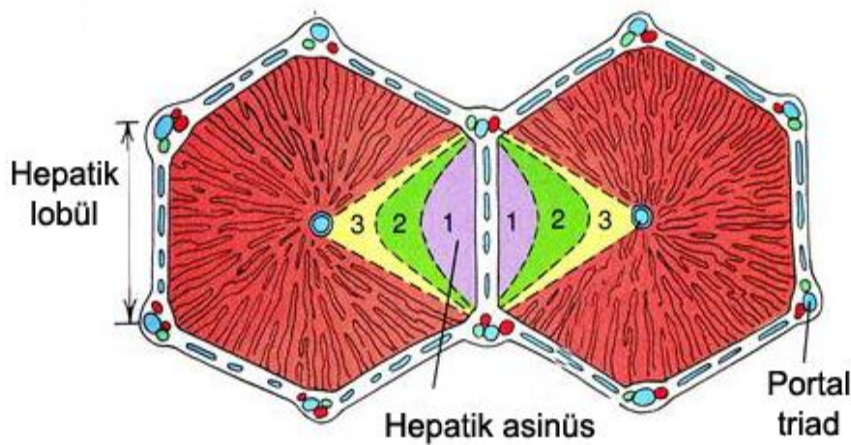
GİRİŞ

Karaciğerde kronik yangısal yanıtı neden olan bir çok faktör organı hasardan koruyan ve karmaşık bir süreç olan fibrozise yol açar. Karaciğerde fibrozise neden olan major fibrojenik hücre Hepatik Stellat Hücrelerdir. Myofibroblastik aktiviteye sahip bu hücreler sinuzoidlerde kontraksiyona neden olur ve adeta bir kollagen üretim merkezi gibi görev yaparak, Disse aralığını kendi ürettiği kollagen ile doldurarak fibrozise neden olur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda fibrozise neden olan sadece HSH değil hepatosit ya da kolanjiyositlerin de epiteliyal mezenkimal değişime uğrayarak ekstrasellüler matriks proteinlerini salgılamasıdır. Bu değişim bir çok uyaran ve kompleks olaylar sonucunda meydana gelir. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm gösteren bu hücrelerde fibroblast spesifik protein-S100A4, vimentin ve α -düz kas aktininin de-novo ekspresyonunun, bazal membran bileşenlerinden fibronektin ve tip I/III kollagen moleküllerinin üretiminin gerçekleştiği düşünülmektedir. Çalışmamızda karaciğer kalın iğne biopsi materyallerinde periportal alanda izlenen bu epiteliyal-mezenkimal dönüşüme uğramış hücrelerin hem epiteliyal hem mezenkimal belirleyicileri birlikte eksprese ettiğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bölümümüzde incelenmiş karaciğer kalın iğne biopsi materyallerinden farklı fibrozis skorlarına sahip ve yeterli doku örneği bulunan 70 olguya ve değişik nedenlerle (tümör komşuluğu, kist hidatik vs) eksize edilmiş, karaciğer dokusu olağan olarak değerlendirilmiş 20 adet kontrol olgusuna TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -Düz kas aktini, Kollagen tip I ve E-kaderin immunohistokimyasal boyaları uygulanmıştır. Fibrozis gelişim sürecini kavramak, fibrozisin ilerlemesiyle ortaya çıkan ve mutlak ölümle sonlanan sirozda süreci yavaşlatmaya, hatta fibrozisi geriletmeye yarayacak anti-fibrojenik tedavi yöntemlerinin anlaşılmasını ve geliştirilmesini sağlayacaktır. Günümüzde karaciğer fibrozisi engellenebilir ve siroz da geri dönebilir patolojik süreçler olarak kabul edilmekte ve çalışmalar fibrozisi engellemek yönünde yoğunlaşmaktadır.

GENEL BİLGİLER

KARACİĞERİN HİSTOLOJİSİ

Karaciğerin mikroanatomik yapısı, kanın arteriyal ve portal venöz damarlar ile karaciğer parankimine ulaşır, kordonlar biçiminde dizilen hepatositlerce işlendikten sonra terminal hepatik venüllere dökülmesi temel alınarak belirlenmiştir. Bu bakımdan karaciğerde mikroskopik olarak dikkat edilmesi gereken en belirgin yapılar porta hepatis aracılığıyla karaciğere ulaşan, küçük dallar halinde karaciğer parankimine dağılan portal ven ve hepatik arter yanı sıra safra duktusunu da içeren **portal alan** ve **hepatositler**dir (1-4). Karaciğer biopsilerinin yorumlanmasında bilindiği gibi mikroskopik olarak lobülün tanımlanması ve gösterilmesi daha kolay olduğundan histopatolojik tanımlamalarda lobül terminolojisi tercih edilmekle birlikte asinus terminolojisinin de üstünlüğünü savunanlar vardır (2).



Şekil-1: Hepatik lobül ve asinüs

Karaciğer lobülünü oluşturan hepatositler tek hücre kalınlığında olup lobülün periferinden merkezine doğru ışınsal tarzda dizilir. Portal alan çevresinde dairesel dizilim gösteren hepatositler **sınırlayıcı tabaka (limiting plate)** olarak tanımlanır. Komşu iki hepatositin sitoplazma membranlarıyla oluşan **safra kanalikülleri**, karaciğer lobülü boyunca anastamoz yapan kompleks bir ağ oluşturur, sınırlayıcı plağa yakın alanlarda Hering kanallarına ve daha sonra portal alan içerisindeki safra kanallarına bağlanır. Böylece safra, kanın ters yönünde yani klasik lobülün merkezinden periferine doğru akar. Tek sıralı hepatosit kordonunu her iki yanından saran kapiller damarlar, **sinuzoid** olarak tanımlanır. Sinuzoidler, aralıklı endotelial hücrelerle döşeli kapiller damar benzeri yapılardır. Sinuzoidleri döşeyen endotelial hücreler ile hepatositler arasındaki boşluk **Disse aralığı** olarak adlandırılır. Bu aralıkta Tip III ve IV kollagen lifler ile hepatosit membranının mikrovillusları bulunur. Bu alan makromoleküllerin sinuzoidal lümenle hepatositler arasındaki değiş tokuşuna izin verir. Ayrıca sinuzoidal yüzeyde **Kupffer hücreleri**, Disse aralığında ise **hepatik stellat hücreler (HSH)** bulunur. **Hepatik stellat hücreler (ito, liposit ya da karaciğer spesifik perisit olarak da bilinir)** yağ depolayan modifiye fibroblastlar olup kollagen sentezinden sorumludur. HSH, yangısal ya da toksik hasarla myofibroblast benzeri aktif hücrelere dönüşerek lobül içi fibrozise neden olur. HSH rutin preparatlarda çok zor görülebilen bir hücredir. İmmunohistokimyasal olarak sinaptofizin antikoruyla hem inaktif hem de aktif HSH, düz kas aktiniyle ise sadece aktif HSH'ler gösterilebilir (4).

KARACİĞER BİOPSİLERİNE GENEL YAKLAŞIM

Karaciğer biopsilerinin mikroskopik incelemesinde öncelikle temel histolojik yapılara bakılır. İlk olarak portal alan incelenir. Genelde portal alanda yer alan anatomik oluşumlardan hepatik arter ve safra duktusu bir veya ikişer adet olabilir. Ayrıca Glisson kapsülü de örneklenmiş olabilir ve patolojik fibröz doku olarak yanlış değerlendirilebilir. Ancak kapsül dokusu daha yoğun ve matür bir fibröz tabakadır. Mikroskopik olarak ilk önce küçük büyütmede biopsinin boyutu ve yeterliliğine bakılır. Optimal değerlendirme için en az 2 cm uzunluğunda, 16 “gauge” çapında biopsi gereklidir. Gerek kronik hepatit tanı ve skorlaması gerekse de diğer hastalıkların değerlendirilebilmesi için biopsinin en az 11 portal alan içermesi gereklidir.

Genel yapıdaki değişiklikler; distorsiyon, düzensizlik, fokal lezyonlar, değişikliklerin dağılımı, parankimal nodülarite ve fibrozis değerlendirilir. Küçük büyütmede genel bir kanı oluştuktan sonra büyük büyütmeye geçilerek lobül içindeki bulgular; inflamasyon, kolestaz, fibrozis, hepatositlerde zedelenme, nekroz varlığı, hücre içi madde birikimleri, hepatik kordonların durumu (hiperplazi, displazi, rejenerasyon) değerlendirilmelidir. Portal alanda inflamasyon, fibrozis, safra duktus sayısı, hasarı, periduktal fibrozis, safra tıkaçı, safra duktul proliferasyonu değerlendirilir. Santral ven, portal ven ve hepatik arterde inflamasyon, trombozis ve fibroze bakılır. Sinuzoidlerde konjesyon, döşeyici hücrelerdeki değişiklik ve anormal madde birikimi değerlendirilir. Pek çok lezyonda **portal alan ve sentrlobüler hepatositler** hedef olduğu için ilk ve en çok incelenmesi gereken bölümlerdir.

KARACİĞER BİOPSİLERİNDE UYGULANAN HİSTOKİMYASAL BOYALAR

Retikulum Boyası: Retikulum liflerini gösterir. Hepatik hücre kordonları arasında sinuziodleri saran retiküler ağı ortaya çıkarır. Ayrıca nekroz gelişmişse kollaps ile o alanlar daha net ayırtedilebilir.

Masson Trikrom: Tip I kollageni gösterir. Portal alan ve büyük hepatik ven dallarında bulunur. Fibrozisin derecesi için önemlidir.

Tip I ve V kollagen: Portal alan bağ dokusu ve santral ven (terminal hepatik venül) duvarlarını boyar. Portal alanlardaki normal bağ dokusunun içinde ağırlıklı olarak tip I ve tip V kollagen bulunur. Portal alanlarda tip IV kollagen sadece safra duktuslarının bazal membranında ve damar duvarlarında bulunur. Santral ven (terminal hepatik venül) duvarları tip I ve V kollagen ile boyanırken, Disse aralığındaki kollagen (retikulum lifleri) tip III kollagen ile boyanma özelliği gösterir.

Demir Boyası (Prusya mavisi): Hemosiderin birikimini gösterir. Safra yeşil; lipofuksin ise sarı kahverengi boyanır.

Diastazlı PAS: Lipofuksin ve seroid pigmentini, safra duktuslarının bazal membranını veduktulleri gösterir.

Orsein: Akut hepatik nekroz ile fibröz septumu ayırt etmek için elastik lifleri göstermesi yanı sıra hepatit B yüzey antijeni, lizozomlardaki çözünmeyen metallothionin gibi bakıra bağlanan proteinleri ortaya çıkarmada kullanılır.

Rhodanin Boyası: Bakır birikimini göstermek için kullanılır (4).

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYALAR

CD31: Normal sinuzoid endotelini döşeyen hücreler CD31 ile pozitif boyanırken, CD34 ile negatiftir. Bazı sirotik nodüllerde sinuzoidlerde CD34 pozitifliği belirirken, benign ve malign karaciğer tümörlerinde CD34 pozitifliğinin şiddeti ve yaygınlığı artar.

CD34: Kapillerleşmiş sinuzoidleri gösterir (3).

KARACİĞER HASARINDA GÖRÜLEN ELEMENTER LEZYONLAR

HEPATOSİT DEJENERASYONU VE NEKROZ

Balon dejenerasyonu ve apoptozis

Hepatosit hasarı ve takip eden nekroz iki majör formda izlenir. İlki **balon dejenerasyonu** olarak tanımlanır. Karaciğer hücreleri şişkin, yuvarlak soluk sitoplazmalıdır, sitoplazmik kalıntılar nükleus etrafında toplanır, hücre membranları belirgin değildir. Nükleuslar şişkin olup, nükleol belirginliği ve nükleer membran yoğunluğu vardır. Balon hepatositler litik nekroza giderken bu hücrelerin bulunduğu hepatosit kordonları kaybolur, bu alan kollaps odağı şeklinde görülür ve bu alanda lenfositler ile az sayıda Kupffer hücresi bulunur. Hepatosit sitolizi küçük olduğunda gözle görülmez ancak inflamasyon içeren odağın varlığı ile anlaşılır. Alternatif olarak hepatosit sitoplazmasında tutulan safra da hepatositlere balon dejenerasyonu gibi şişkin köpüksü bir görünüm verebilir. Safra yolları patolojilerinde izlenen bu bulgu tüysü dejenerasyon olarak tanımlanır. Hepatosit hasarının bir diğer formu **asidofilik dejenerasyon ve ölümdür**. Bu durumda hücreler, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, piknotik veya parçalı nükleuslu görülür. Bazı hücreler ise büzüşmüş, nükleer yapısı olmayan asidofilik cisimcik şeklinde olabilir. Apoptozis ile hücre ölümünün göstergesi olan bu yapılar Councilman cismi olarak da adlandırılır. Bu hücreler de Kupffer hücrelerince fagosite edilir. Her iki şekilde olan hepatosellüler nekroz, tek tek veya bir grup hepatositi etkiler. Bu şekilde fokal olarak hücrelerin yokluğu ve o alanda lenfositlerin bulunması **fokal nekroz** olarak tanımlanır. Bu alanlar retikulum ile boyandığında stromal kollaps izlenir.

Konfluent nekroz

Fokal nekroza göre biraz daha yoğun ve ağır hepatosellüler hasar sonucu daha fazla komşu hepatosit grubunun kaybı ile karakterli nekroz türüdür. İki şekilde olabilir. Zedelenmenin süresi ve tipine bağlı olarak balon dejenerasyonunu takiben veya daha az sıklıkta iskemi benzeri koagulatif

değişiklikleri takiben oluşabilir. Genellikle zonal dağılım gösterir. Özellikle sentrilobüler konfluent nekroz, hepatotoksik ilaç kullanımlarında (toksik hepatit), mantar ve karbon tetraklorür zehirlenmelerinde, hipoperfüzyon durumlarında (şok, sol kalp yetmezliği) izlenir. Fokal nekrozda olduğu gibi nekrotik alanda lenfosit ve makrofajların birikimi, retikulum kollapsı, ağır vakalarda portal alanların çevresinde safra duktul proliferasyonu izlenir.

Güve yeniği (“piece-meal”) nekrozu veya interfaz hepatit

Portal alanı infiltre eden yangı hücrelerinin portal alan sınırını (limiting plate) aşması periportal parankime ilerlemesi ile karakterli nekroz türüdür. Kronik hepatitlerde sık görülür. Bu nekroz türünün nedeni tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte immunolojik reaksiyon olarak kabul edilmektedir. Burada biriken hücrelerin çoğunluğu CD8 T lenfositler, az bir kısmı da CD4 T lenfositlerdir. Yangı hücreleri yerine bu şekilde safra duktuslarının periportal parankime ilerlemesi ise duktuler “piece-meal” olarak tanımlanır ve çeşitli kronik kolestatik hastalıklarda karşımıza çıkar.

Köprüleşme nekrozu

Vasküler yapıları birbirine bağlayan; santral ven ile portal alan arasında veya her iki portal alan arasında izlenen nekrozdur. Santral ven ile portal alanlar arasındaki köprüleşme nekrozu genelde kronik hepatitte izlenir. Köprüleşme fibrozisinden ayırt etmek için histokimyasal boyalar yardımcı olabilir. Nekroz eğer bir lobülü kapsıyorsa **submasif nekroz**, karaciğerin pek çok alanını içeriyorsa **masif nekroz** olarak tanımlanır. Bu tür geniş nekrozlar genellikle karaciğer yetmezliğinde görülür.

İNFLAMASYON

Akut ve kronik yangı hücrelerinin varlığı ile karakterlidir ve hepatit olarak tanımlanır. Hepatosit nekrozu sonrası görülebildiği gibi tersi de olabilir. Hepatositlerin T lenfositler tarafından saldırıya uğraması, karaciğer hasarının temel nedenidir. İnflamasyon portal alana sınırlı olabildiği gibi tüm parankime de yayılabilir.

REJENERASYON

Karaciğer rejenerasyon kapasitesi oldukça yüksek bir organdır. Mitoz ile ortaya çıkan hepatosellüler proliferasyon, hepatosit kordonlarını kalınlaştırır ve parankimal yapılarda disorganizasyona yol açar. Nükleuslar perifere doğru yer değiştirir. Safra duktus proliferasyonu da izlenir. Hepatosellüler nekroz olduğunda eğer retikulum çatısı korunmuşsa fulminant karaciğer yetmezliği bile olsa karaciğerin rejenerasyon yeteneği sürer ve doku eski halini alabilir.

FİBROZİS

Kronik zedelenme sonucu karaciğer içinde fibrozis oluşturan mekanizmalar harekete geçer. Periportal alanda ve eğer varsa kollaps alanlarının üzerinde gelişen fibrozis zamanla ilerler ve fibröz bantlar karaciğerin çeşitli bölgelerini birleştirerek köprüleşme fibrozisini ortaya çıkarır. Fibrozis zamanla mikroasiner yapıyı bozar ve karaciğer içi kan akımını etkiler. Sonuçta ilerleyerek bağ dokusu ile çevrelenmiş rejenere hepatositlerden oluşan parakimal nodüller ile karakterli siroz gelişimine neden olur. Fibröz doku gelişimi, inflamasyon veya toksik hasara karşı gelişen bir cevaptır. Genellikle irreversibldir.

KOLESTAZ

Safranin karaciğer parankimi içinde patolojik birikimidir. Böylece safra H&E kesitlerde görülebilir hale gelir. Akut, kanaliküler veya duktuler kolestaz şeklinde olabileceği gibi kronik formlarda kolat stazı şeklinde de olabilir. Sarı yeşil pigment birikimi hepatosit ve Kupffer hücrelerinde izlenince kanaliküler safra tıkaçlarının varlığı araştırılmalıdır (5).

KRONİK HEPATİT NEDENLERİ VE MORFOLOJİK BULGULAR

Kronik hepatit, kalıcı ve sıklıkla ilerleyici bir karaciğer yangısı olup, histolojik olarak portal alanlarda ve parankimde lenfositik infiltrasyon, hepatosit hasarı ve fibrozis ile karakterizedir. Tanısı için hepatite özgü klinik, serolojik ve histolojik bulguların 6 aydan fazla sürmesi esas alınmıştır. Kronik hepatit etiyolojisinde pek çok etken rol almaktadır. Bunların başında Hepatit B, C ve D virüsleri (HBV, HCV, HDV) gibi viral nedenler gelmektedir. Otoimmünite, ilaç kullanımı ve toksik maddeler diğer önemli nedenlerdir. Bunlardan başka Wilson Hastalığı, α -1 antitripsin eksikliği, hemokromatozis gibi metabolik hastalıklar ve primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit gibi inflamatuvar safra yolu hastalıkları da kronik hepatit histopatolojisi ile karşımıza çıkabilir. Uzakdoğu, Ortadoğu ve bu kuşakta yer alan ülkemizde kronik hepatit etiyolojisinde en sık viral hepatitler görülürken, batı ülkelerinde en sık neden alkol kullanımıdır. Ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda etiyolojik neden olarak viral hepatitlerin görülme sıklığı %50-90 arasında değişmekte iken, alkolik siroz sıklığı %10 dolaylarındadır. Ayrıca nedeni bilinmeyen kriptojenik hepatit diye adlandırılan küçük bir grup daha vardır (6).

Kronik hepatitte histopatolojik değişiklikler dört grupta toplanabilir; portal yangı, lobül içi degenerasyon ve nekroz, periportal güveyeniği (piecemeal) nekrozu (interface hepatit, portal/septal sınır hepatiti). Dördüncü temel değişiklik bu olayların sonucunda gelişen fibrozistir. Tüm bu değişiklikler karaciğer içinde düzensiz olarak dağılır. Portal yangı oluşturan hücreler başlıca lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar, bazen bunlara ek olarak az miktarda nötrofil ve eozinofillerdir. Lobül içi degenerasyon ve nekroz ise kendini hepatositlerde şişme, parankim hücrelerinin küçük gruplar halinde nekroza uğradığı ve bunların yerini mononükleer hücrelerin aldığı fokal nekrozlar ya da tek hücre nekrozları sonucunda oluşan asidofilik cisimcikler (Councilman cisimcikleri) olarak gösterir. Periportal güve yeniği nekrozu

(interfaz hepatit, portal sınır hepatiti), kronik hepatitin aktivitesini en fazla etkileyen lezyon olup, hepatositin hücresel immün yanıtı tarafından programlanan nekrozudur. Örneğin; HBV hepatitinde hücre hasarını oluşturan faktör, virüs antijenlerinin uyardığı immün reaksiyon olup, virüsün doğrudan sitopatik etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Akut ve kronik hepatitte yangısal hücre infiltrasyonunun başlıca mononükleer hücrelerden oluşması ve immunsupresif kişilerde nekro-inflamatuar aktivitenin düşüklüğü de bu görüşü desteklemektedir (7). Pek çok karaciğer hastalığının patogenezinin temelini T hücre aracılı hepatosellüler hasar oluşturur (8). İmmunohistokimyasal çalışmalarda portal alanın kenarında güve yeniği nekrozunu oluşturan hücrelerin supresör/sitotoksik CD8+ T lenfositler olduğu, portal alanın ortasındaki hücrelerin ise helper/inducer CD4+ T lenfositler olduğu gösterilmiştir (7). Yakın zamanlı bir çalışmada ise bu lenfositlerin lenfoblast morfolojisinde olduğu ileri sürülmüştür (9). Hepatit gelişiminde viral etkenlerin yanı sıra dolaşımda mevcut olan mediatörler ve oksidatif stres de rol oynar. İnflamatuar hücrelerin salgıladığı sitokinler, dolaşımdaki mediatörler ve oksidatif stres birleşerek HSH'nin myofibroblasta dönüşmesini sağlar (10). Aktif HSH, antijen sunabilen bir hücredir ve ayrıca makromolekülleri ve bakterileri fagosite edebilir. T lenfositlerden salınan IL-6, IL-10, IFN gibi sitokinler HSH'nin pek çok önemli fonksiyonunu etkilemektedir (11). Kronik hepatitte hücre hasarı sonucu gözlenen bir diğer özellik de hepatosit regenerasyonudur. Bu, hücre kordonlarının iki ya da daha çok sıralı hal alması veya rozet şeklinde dizilmeler, çift çekirdekli hücrelerde artma, hücre çekirdeklerinde büyüme ile kendini belli eder (5). Hepatosit regenerasyonunun devam etmesi halinde hiperplastik ve displastik nodüllerin geliştiği ve bu lezyonların hepatosellüler karsinom (HSK) için öncül lezyonlar olduğu bildirilmektedir (12,13).

Özel kronik hepatit tiplerinde görülen özgün morfolojik bulgular:

Kronik Hepatit B:

Kronik hepatit B'nin en ayırt edici morfolojik özelliği H&E boyalı kesitlerde izlenebilen buzlu cam görünümünde hepatositlerdir. Hepatosit sitoplazmasında HBsAg birikimine bağlı düz endoplazmik retikulum proliferasyonu sonucu, hepatosit sitoplazması ince granüler, soluk eozinofilik hal alır ve nükleus kenara itilir(14, 15).

İmmunohistokimyasal olarak HBV antijenlerinin dokuda gösterilmesinin kronik hepatit B tanısını koymada yardımcı olmak yanı sıra hastalığın viral fazını da belirleyebileceği öne sürülmektedir (15,16). Kronik hepatit B'nin seyrinde üç farklı viral faz tanımlanmaktadır; viral tolerans (viral replikasyon) fazı, virüs klirensi fazı ve nihai integrasyon fazı. Bu fazlarda HBV antijenlerinin karaciğer dokusunda ekspresyonu fazla olmaktadır (17,18).

Viral replikasyon fazı immun tolerans fazıdır ve bu dönemde hepatosit hasarı ve inflamasyon hafiftir. Bu dönemde hakim HBcAg boyanma paterni nükleer iken, HBsAg hepatositlerin çoğunda membranöz boyanma paterni gösterir (19-22). Viral klirens fazında ise karaciğerde histopatolojik olarak lezyonların şiddeti ağırdır, değişken derecelerde konfluent nekroz da olabilir(23,24). Bu dönemde HBc Ag nükleer, sitoplazmik ve membranöz pozitiflik gösterebilir. Sitoplazmik HBcAg pozitifliği karaciğerdeki hasarın şiddeti ve hepatosit rejenerasyonu ile korelasyon gösterir (19,20). Viral integrasyon fazında aktif HBV replikasyonu durmuştur ama HBsAg, entegre olmuş HBV DNA'yı taşıyan hepatositlerde yapılmaya devam eder. Yaygın hepatosit gruplarında HBsAg birikir, HBcAg genellikle saptanamaz (25).

Kronik Hepatit C:

Kronik C hepatitinde patognomonik ve diagnostik bir morfolojik özellik bulunmamakla birlikte nispeten ılımlı bir kronik hepatit tablosu ve buna eşlik eden portal alan lezyonları vardır. Bu portal alan lezyonları; lenfoid agregat ve/veya lenfoid folikül oluşumu, hepatik safra kanalı lezyonları yanı sıra

sinuzoidal yangısal hücrelerin aktivasyonu, makroveziküler steatozis, asidofil değişikliğe uğramış hepatositlerin sıklığı gibi morfolojik özellikler Kronik C hepatiti için karakteristiktir (26-30).

Kronik Hepatit D:

HBV enfeksiyonu üzerine yerleşen HDV enfeksiyonu, sadece HBV'ye bağlı gelişen kronik hepatite oranla morfolojik olarak daha şiddetli bir tablo yapar. HDV enfeksiyonuna özgü bir morfolojik bulgu yoktur. Sadece HDV'li olgularda portal alanlarda belirgin lenfoid agregatlar gelişebilir (31, 32). Virusun dokudaki varlığı ancak immunohistokimyasal olarak Delta antijeninin hepatosit nükleuslarında gösterilmesi ile mümkündür (33).

Otoimmün hepatit:

Plazma hücreleri, emperipolezis, peripolezis, interfaz hepatitin belirgin oluşu ile ayırt edilebilir (5).

KRONİK HEPATİTLERDE ISHAK SKORLAMASI

Karaciğer biopsisi, bugün için kronik hepatitlerde hastalığın derecesi ve evresinin tedavi öncesi ve sonrasında belirlenmesinde altın standart olma özelliğini henüz yitirmemiştir. Klasik olarak, kronik hepatitin nekro-inflamatuar aktivitesi olarak tanımlanan derece (grade) ile fibrozis ve yapısal değişikliklerin derecelendirildiği evrenin (stage) skorlanması tüm skor sistemlerinin temel hedefidir. Morfolojik bulguların tanımlanmasında getirilen kriterlere aşına olan deneyimli patologlar arasında fazlaca uyum problemi olmamakla birlikte, morfolojik bulguların sayısal değerlere dönüştürülmesi başlıca zorluklardan birini oluşturmaktadır. 1994'te Kemal Ishak'ın başkanlığını yaptığı bir uluslararası panel, klinik tedavi çalışmalarına veri sağlamada yardımcı olacak bir skarlama sistemini önermiş ve bu skorların biopsideki lezyonları tanımlayacak şekilde raporlanmasını sağlamak amacını hedeflemiştir (34). Bu skarlama sisteminin tanımladığı 4 kategori esas olarak hastalığın nekro-inflamatuar aktivitesi ile ilişkilidir (Tablo 1).

Tablo 1: İshak skorunda nekroinflamatuvar aktivitenin modifiye evrelendirilmesi için skorlanan parametreler ve verilen değerler

Periportal veya periseptal interface hepatit

Yok=0
Hafif (fokal, az sayıda portal alan)=1
Hafif/orta (fokal, çoğu portal alanda)=2
Orta (portal alan veya septaların %50'den azı)= 3
Şiddetli (portal alan veya septaların %50'den çoğu)=4

Konfluent nekroz

Yok=0
Fokal konfluent nekroz=1
Bazı alanlarda zon 3 nekroz=2
Çoğu alanlarda zon 3 nekroz=3
Zon 3 nekroz+ nadir P-S köprüleşme=4
Zon 3 nekroz+ multipl P-S köprüleşme=5
Panasiner veya multiasiner nekroz=6

Fokal litik nekroz, apoptoz ve fokal inflamasyon

Yok=0
10xBB'de 1 veya daha az=1
10xBB'de 2-4=2
10xBB'de 5-10=3
10xBB'de 10'dan fazla= 4

Portal İnflamasyon

Yok=0
Hafif, bazı veya tüm portal alanlarda=1
Orta, bazı veya tüm portal alanlarda=2
Orta/belirgin, tüm portal alanlarda=3
Belirgin, tüm portal alanlarda=4

(BB: büyük büyütme alanı)

Knodell ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan Histolojik Aktivite İndeksinin en önemli sakıncalarından biri periportal veya periseptal “interface” hepatit ile köprüleşme nekrozunu aynı kategoride değerlendirmesidir (35). Ishak skoru bu iki parametreyi ayırarak farklı patogeneze ve prognostik öneme sahip iki lezyonu ayrı ayrı değerlendirmeye almıştır (36). Bu uluslararası panel, köprüleşme nekrozu terimini portal alanlar ile santral venler arasında gelişen, genellikle perivenüler nekroz halinde başlayan ve asinus modelindeki zon 3’ün nekrozunu temsil eden portal-santral köprüleşme nekrozu ile sınırlı tutmuştur (34). İntrahepatik şantlar oluşumuna neden olduğu için, portal-santral köprüleşme nekrozunun patogenetik öneminin portal-portal veya santral-santral köprüleşmelere göre daha fazla olduğu bugün genel kabul görmektedir (7). Bu şekilde yaygın konfluent yani litik nekroz ile ortaya çıkan kollaps niteliğindeki köprüleşme nekrozu ile portal alanlar arasında “interface” hepatitin ilerlemesi ile gelişen portal-portal köprüleşme fibrozisinin karıştırılmasını da önlemişlerdir. Konfluent nekroz, viral hepatitlerde daha çok akut viral hepatitte ve kronik zemindeki akut alevlenmelerde görülmekle birlikte, otoimmün hepatitlerde de akut veya kronik zeminde sık görülmektedir (37,38). Kronik viral hepatit sürecinde portal alanlarda başlayan periportal fibrozis ile sonuçta gelişen siroz arasında geniş bir morfolojik spektrum bulunmaktadır. Bu geniş morfolojik spektrumun, karaciğerin 50.000 ile 100.000’de birini yansıtan bir iğne biopsisinde değerlendirilerek zorlanmadan sayısal değerlere dönüştürülebilmesi için kullanılan parametre spektrumunun da aynı ölçüde geniş olması gerekmektedir (Tablo 2).

Tablo 2: Ishak skorunda evreleme için skorlanan parametreler ve verilen değerler

Yapısal değişiklikler, fibrozis ve siroz

Yok=0
Bazı portal alanlarda fibröz genişleme (kısa fibröz septa var veya yok)=1
Çoğu portal alanlarda fibröz genişleme (kısa fibröz septa var veya yok)= 2
Çoğu portal alanlarda fibröz genişleme+ nadir portal-portal köprüleşme= 3
Portal fibröz ekspansiyon+ belirgin P-P veya P-S köprüleşme=4
Belirgin köprüleşme (P-P ve P-S)* nadir nodül (inkomplet siroz)=5
Siroz (muhtemelen veya kısmen)=6

*P-P: portal- portal, P-S: portal- santral.

Bu tür detaylı bir skor, daha basit değerlendirme sistemlerine göre daha az tekrarlanabilirlik gösterse de, hasta bazında daha fazla bilgi vermektedir ve aynı hastanın izleminde daha kullanışlı olmaktadır. Ishak skorunda iyi bir gözlemciler arası uyum bildirilmiştir. Knodell'a göre en önemli üstünlüğü fibrozisin skorlanmasında beklenen Ishak skoru, ilginç olarak nekro-inflamasyonun değerlendirilmesinde daha iyi tekrarlanabilirlik göstermektedir (37).

FİBROGENEZİS MEKANİZMALARI

Karaciğer sirozunun temel morfolojik değişikliğini oluşturan fibrozis, ekstrasellüler matriksin yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin bozulmuş olmasının bir neticesidir. Siroz patogenezi ile ilgili bilgilerimiz, 1982’de Leeuw ve arkadaşları tarafından ilk kez tanımlanan HSH ile belirgin aşama kaydetmiştir (39). Karaciğerin hücresel yapısının yaklaşık %65’ini hepatositler, %35’ini ise parankim dışı hücreler oluşturur. Parankim dışı hücre topluluğunun büyük kısmı (%70) endotelial hücrelerdir. Kupffer hücreleri %20, HSH yaklaşık %10 kadardır. Ekstrasellüler matriksin yapısında başta kollagen olmak üzere, proteoglikanlar, fibronektin, nidogen, elastin, laminin, hyaluronat ve tenascin gibi matriks proteinleri bulunur. Bu proteinler karaciğerdeki farklı hücresel komponentler tarafından sentezlenip salgılanır (40) (Tablo- 3).

Tablo-3: Karaciğerde ekstrasellüler matriksi sentezleyen hücreler ve sentezledikleri matriks proteinleri (40).

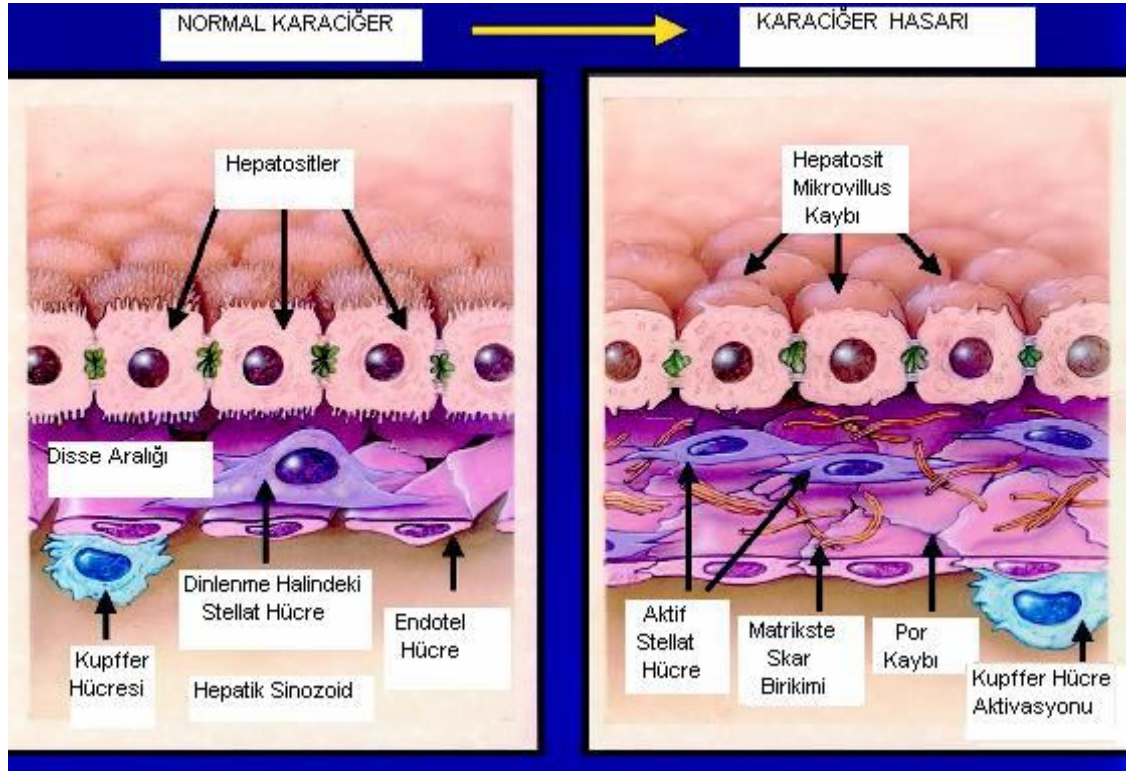
MATRİKS PROTEİNİ	HEPATOSİT	HSH	ENDOTELİYAL HÜCRELER	KUPFFER HÜCRELERİ	SAFRA YOLU EPİTELİ
Fibronektin	+	++	-	-	?
Laminin	-	+	-	-	+
Kollagen-1	+/-	+	-	-	-
Kollagen-3	+/-	++	-	-	-
Kollagen-4	-	+	+	-	+
Decorin	-	+	?	-	?

Normal karaciğerde interstisyel kollagenler (Tip I ve Tip III) portal alanlarda ve santral venler çevresinde bulunur. Disse aralığında ise Tip IV kollagen (retikulum) de içeren bazal membran benzeri bir matriks vardır (41). Sirozda esas olarak Tip I ve Tip III kollagen birikir. Alkol zararı ve demir birikimine bağlı fibrozis perivenüler/perisentral bölgeden (zon-3), diğer nedenlere bağlı fibrozis ise periportal bölgeden (zon-1) başlar (42). Ancak etioloji ne olursa olsun fibrotik karaciğerde ekstrasellüler matriksin komponentleri aynıdır (43). Disse aralığında biriken kollagen lifleri birleşerek geniş ve belirgin septumlar oluşturur. Bu septumlar içinde yeni gelişen damar yapıları mevcuttur ve bunlar portal bölge (hepatik arter ve portal ven) ile terminal hepatik venler arasında şant oluşturarak kanın parankime (sinuzoidlere) uğramadan venöz sisteme geçmesine ve parankim hasarının artmasına neden olur. Disse aralığındaki kollagen birikimi nedeniyle sinuzoidal endotel hücrelerinin aralarındaki boşluklar kapanır, sinuzoidler bazal membran kazanarak kapiller damara benzer (sinuzoidal kapillerizasyon) bir özellik kazanır. Buna bağlı olarak karaciğer parankimindeki vasküler direnç artar ve hepatosellüler protein sekresyonu (albumin, pıhtılaşma faktörleri, lipoproteinler v.b.) ciddi olarak engellenir. Böylece sirozda saptanan laboratuvar bulguları (sözü geçen proteinlerin kandaki düşüklüğü v.b) ortaya çıkar. Parankimin oksijenlenmesi azalınca, HSH aktivasyonu bu kez de hipoksik uyarıyla devam eder; yani bir kısır döngü başlar. Sağlam kalan hepatositler rejenere olarak çoğalır ve mevcut fibröz septumların arasında nodüller halinde büyümeye başlar. Bu nodüllerin damarlara yaptığı basıyla iskemik hasar iyice artar. Aşırı kollagen üretiminin kaynağı Disse aralığındaki perisinuzoidal HSH'dir. Siroz gelişimi sırasında bu hücreler aktive olur, retinil ester depolarını kaybeder, myofibroblast benzeri hücreler haline gelir; kontraksiyon yapmasının yanı sıra kollagen de sentezlemeye başlar ve hücre yüzey reseptörlerinde değişiklikler meydana gelir. HSH'nin uyarılması ve kollagen sentezinin başlaması aşağıda sıralanan pek çok sebebe bağlı gelişebilir:

- Kronik yangı hücrelerinden sitokinlerin salınması (Tümör nekroz faktörü- α , Transforming growth factor- β (TGF- β), İnterlökin-1 v.b.)
- Uyarılan endojen hücrelerden (Kupffer hücresi, endoteliyal hücre, hepatosit, safra duktus epitel hücresi) sitokin salınması
- Ekstrasellüler matriks hasarı
- HSH'nin toksinler tarafından doğrudan hasarı (40, 44, 45)

Fibrozis, HSH aktivasyonu ile başlamakla birlikte daha sonra parakrin etkili sitokinlerle (IL-8 ve 10 gibi) hepatositlerde gen ekspresyon değişiklikleri olur. Ancak bu evre henüz preinflamatuar bir evredir. Sonraki aşama ise çeşitli büyüme faktörlerinin (TGF- β gibi) parakrin ve otokrin etkileriyle, fibrozisin dinamik bir süreç olarak devam etmesidir. Bu evrede uyaran ortadan kaldırıldığı takdirde ise fibrozis geriler (39, 41). HSH'nin bu süreç içindeki fonksiyonları sırasıyla; proliferasyon, migrasyon, kontraksiyon ve anjiogenezdır (46).

Aktif HSH'nin dokuya T hücresinin gelmesini engellediğini ve mevcut T hücrelerinin de apoptoza gitmesine sebep olduğunu gösteren deneysel çalışmalar vardır. Bu durumun iyileşmeyi engellediği ve fibrozisin ilerlemesine sebep olduğu ileri sürülmektedir (9). Tüm bu bulgular HSH'yi karaciğerdeki yangısal ve fibrotik olayları yöneten bir orkestra şefi haline getirmektedir. Bu nedenle güncel çalışmaların çoğu HSH'nin kökenini araştırmaya, genetik defektleri ortaya koymaya ya da bu hücrenin aktif ve inaktif formlarında hangi moleküllerin eksprese edildiğini saptamaya yöneliktir.



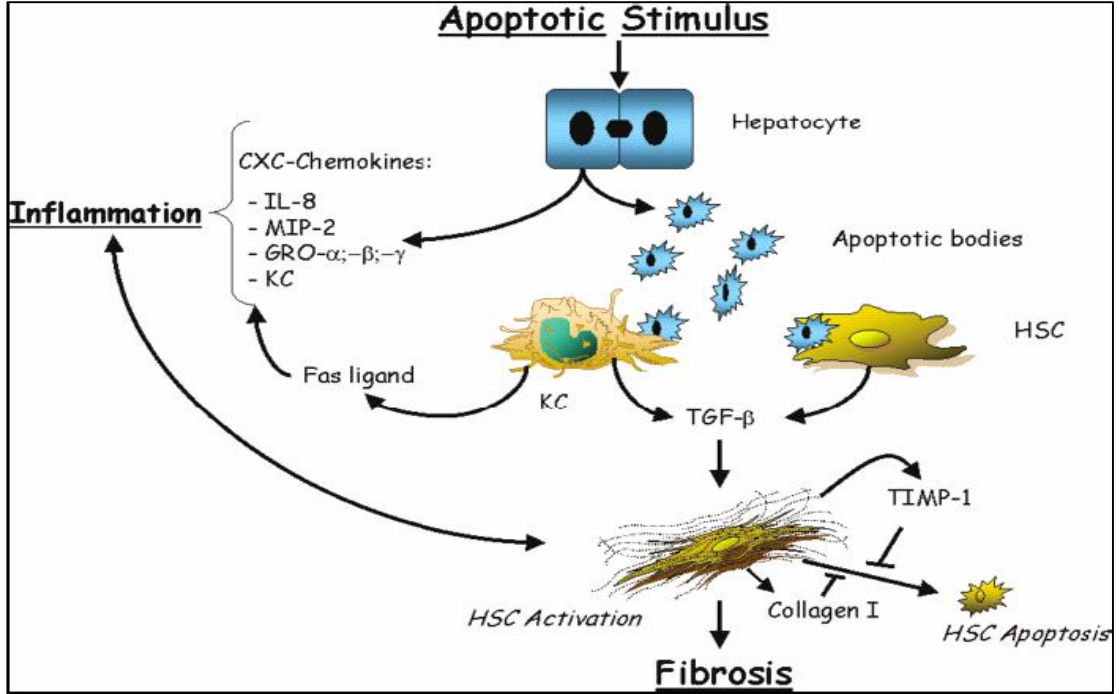
Şekil-2: Karaciğer hasarında meydana gelen fibrozis süresince gelişen sinuzoidal olaylar.

Dinamik bir süreç olan sirozda yangısal aktivite de bu sürecin bir parçasıdır ve siroz tam olarak geliştiğinde bile yangısal süreç devam ediyor olabilir. Yine de aktif sirozlarda bulgular etiyolojiye göre değişiklik gösterir (47). İnaktif sirozda ise nekro-inflamatuvar aktivite yoktur, septumlar ile nodüller arasında keskin bir sınır vardır (48). Fibrozis erken dönemde görülmesine de, tüm kronik hepatitlerde bir süre sonra ortaya çıkar ve kalıcı niteliğini matür kollagen ve zamanla artan elastik lif varlığı belirler. Bağ dokusu boyalarıyla retikulum lifleri yanında tip I ve tip III kollagen ve lezyonun en az bir kaç aylık olduğunu belirten elastik lifler gösterilebilir.

Sirozun geri dönüşsüz bir olgu olduğuna dair mevcut olan dogma yerini; siroz durdurulabilir mi?, geriletebilir mi?, tamamen geri dönebilir mi? tartışmasına bırakmıştır. Pek çok deney göstermiştir ki; karbon tetra klorür

(CCl4) ile oluşanlar dışındaki deneysel sirozlar gerileyebilmektedir. Ancak CCl4 ile geliştirilen sirozlarda; ekstrasellüler matrikste kollagen bantlarının arasında çapraz bağlar olduğundan ve bu bantlar normalden çok daha kalın olduğundan siroz gerilemesi görülmemektedir (39). Diğer bir deyişle, ekstrasellüler matriksin üç boyutlu yapısı da fibrozisin geri dönebilmesi için önemli bir kriterdir. Bu yapı, kollagen bantlar arasında oluşan çapraz bağlarla karmaşık bir hale geliyorsa fibrozisin geri dönebilme şansı azalır (49). Anti-fibrotik ilaçların aktif fibrojenezi gerilettiklerini, ancak tamamlanmış bir sirozda her zaman işe yaramadıklarını gösteren deneyler de yayınlanmaktadır (50).

Apoptoz, karaciğerde toksik olaylar, viral hepatitler, alkolik karaciğer hastalığı, non-alkolik yağlı karaciğer hastalıkları, kolestatik karaciğer hastalıkları ve iskemik/reperfüzyon hasarı gibi pek çok durumda verilen ilk hücresel cevaptır. Hastalığın şiddeti, süresi ve fibrozisin derecesiyle doğru orantılı olarak hepatosit apoptozu artar. Apoptozun zararsız ve hatta fizyolojik bir savunma mekanizması olduğuna dair yerleşik bir dogma nedeniyle son yıllara dek hepatosit apoptozunun üzerinde pek durulmamıştır. Oysa günümüzde hepatosit apoptozu; inflamasyon ve fibrozisin yalnızca bir sonucu değil, tam tersine bu patolojik mekanizmaları tetikleyen ve arttıran bir uyarıcı olarak kabul edilmektedir. HSH ise; bu apoptoz ve yangısal süreçte de rol alan anahtar fibrojenik hücredir. Karaciğer hasarı azalır ya da gerilerse, HSH sayısı da apoptozla spontan geriler. Bir kaç yıl öncesine kadar HSH'nin apoptozla yok olabildiği yalnızca hücre kültürlerinde kanıtlanabilmişti. Ancak son yapılan çalışmalarla in vivo olarak da bu kanıtlanmıştır. Bu yeni gelişme HSH'yi apoptoza sürükleyerek fibrozisin geriletilebileceği ve bunun siroz tedavisinde kullanılabileceği fikrini doğurmuştur (10).



Şekil-3: Apoptotik uyarı ile fibrozis arasındaki ilişki (10)

TRANFORMİNG GROWTH FACTOR- β VE FİBROGENEZİSTEKİ ROLÜ

TGF- β ailesi, izoformları (aktivinler, inhibinler, kemik morfogenez proteinleri, büyüme ve diferansiasyon faktörleri, anti-Müllerian hormon ve myostatinler) da bulunan 40 ayrı molekülden oluşur (51, 52). TGF- β , 25-kDa ağırlığında, 112 amino asitten oluşan, homodimerik bir polipeptittir. Epitelial, endotelial ve hematopoetik hücrelerde bulunur; genellikle çoğalmayı inhibe edici, bazı hücre tipleri için ise uyarıcı etkiye sahiptir. TGF- β 'nın 5 tipi vardır. Bunlardan yalnızca ilk üçü memelilerde bulunur; TGF β 1, β 2 ve β 3 (42, 52-55). Her üçü de karaciğerde mevcut olsa da, farklı hücreler tarafından da üretilmektedir (46). İnaktif formda sentezlenen TGF- β 'nın biyolojik olarak aktif hale geçebilmesi için LAP (Latent Associated Protein) ve LTBP (Latent TGF- β Binding Protein) gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanması gereklidir. Aktif formu bir kaç dakika içinde kandan elimine edilir. Yine LAP ve LTBP'nin TGF- β epitoplarını maskeleymesi nedeniyle aktif form, periferik kan

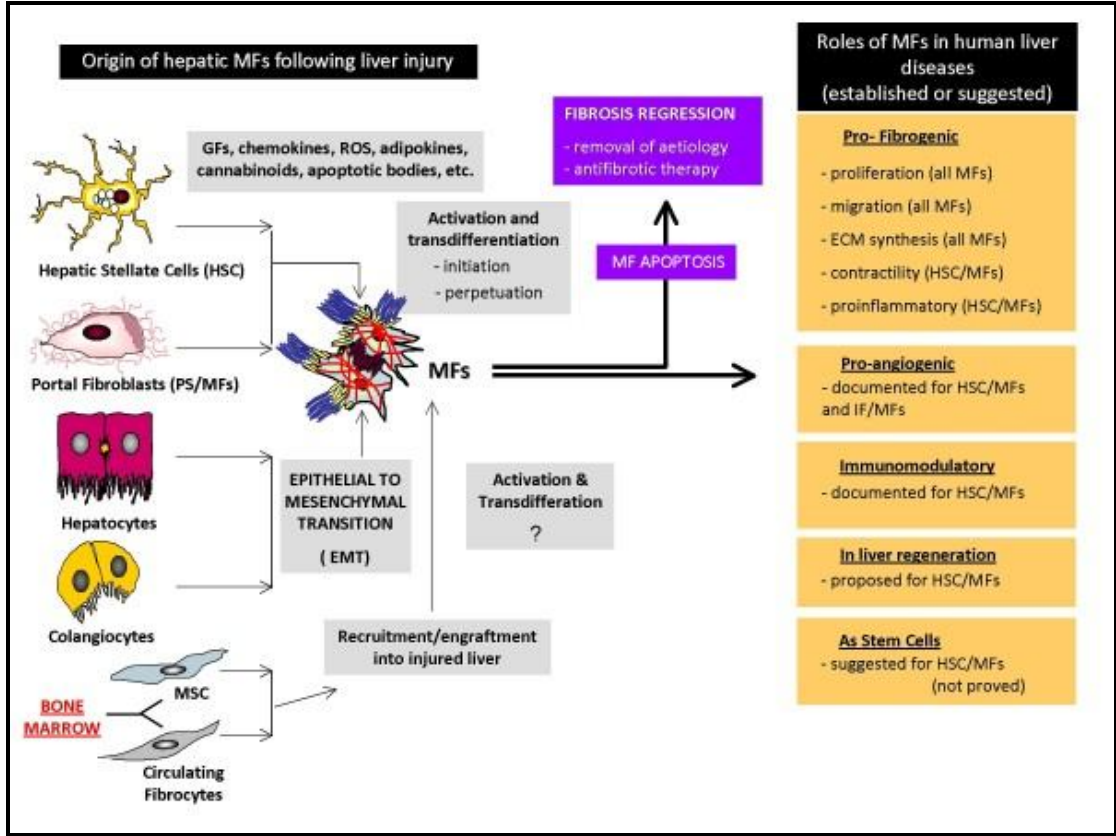
ya da dokularda direkt metodlarla gösterilemez. Ancak dokuda proteinlere bağılı inaktif formu farklı tekniklerle gösterilebilir (55). TGF- β 'nın transmembranöz yerleşimli, homodimerik 3 reseptör formu vardır; TGF β R-1, 2, 3. Endotelial ve hemopoetik hücrelerde TGF β R-1, nöronal ve epiteliyal hücrelerde TGF β R-2, mezenkimal hücrelerde ise TGF β R-3 (betaglikan, endoglin, decorin) bulunur. Genel olarak mezenkimal hücrelerin çoğalmasını uyarırken; epiteliyal hücrelerin çoğalmasını inhibe eder (52). Bu reseptörlerin hücre içi aracı molekülleri ise Smad ailesidir. TGF- β ilk olarak TGF β R-2'ye bağlanır. Bu reseptörün serin/treonin kinaz etkisi vardır. TGF β R-1 ile birleşerek heterodimerize olur ve TGF β R-1'in fosforile olmasına neden olur. Fosforilasyonla aktifleşen TGF β R-1 hücre içi kinazları aktifleştirir, Smad proteinlerine bağlanır ve çekirdekte sonlanan bir iletim yolağını başlatır. Çekirdekte ise hücre döngüsünü kontrol eden siklin bağımlı kinazları (CDK) ve siklinleri inaktive ederek hücreyi G1 fazında durdurur, S fazına geçişi önler (42, 51, 52, 54 ,56). HSH'de bu ileti yolağının çekirdekteki hedefi Id1 genidir (57). TGF β R-1 ve 2'den oluşan reseptör kompleksinin bir kısmında mutasyon olduğu takdirde fonksiyonların yalnızca bir kısmı kayba uğrar, diğerleri ise devam eder. TGF β R-3'ün görevi ise TGF- β 'nın TGF β R-2'ye olan afinitesini arttırmaktır; yani TGF β R-3 bir ko-reseptördür (58).

Kronik karaciğer hasarında ortaya çıkan apoptotik parçacıkların mezenkimal bir hücre olan HSH tarafından fagositozu, bu hücrede TGF- β üretimini uyarır. TGF- β 'nın salınımı ise otokrin mekanizmayla; TGF β R-2'yi kullanarak sirozdaki bağ dokusu artışının temel elemanı olan Tip I kollagenin HSH tarafından üretimini başlatır. Kupffer hücreleri ve trombositler gibi inflamasyonda görevli hücre tiplerinin çoğu TGF- β 1 salgılar. Hepatit gelişimi sırasında yalnızca HSH'nin değil; Kupffer hücreleri, sinuzoidal endotel hücreleri ve portal fibroblastların da fagositoz yeteneği kazandığı ve bu hücrelerin tamamında TGF β R olduğu kanıtlanmıştır (10). "Tümör asosiye makrofajlar" olarak adlandırılan, hipoksi gibi stres hallerinde aktive olan ve TGF- β salgılayarak HSH'nin myofibroblastta diferansiasyonunu tetikleyen

tümöre özel makrofajların varlığından da bahsedilmektedir (59). TGF- β ; HSH'yi myofibroblasta dönüştüren temel uyarandır ve HSH üzerinde anti-apoptotik etkisi vardır; bu etkisini HSH'deki NF-kappaB (inflamatuvar ve immün olaylarda kontrol noktası olan dimerik transkripsiyon faktörü) aktivitesini azaltarak gösterir (49,56). Fibrozisin gelişip gelişmeyeceğini belirleyen mekanizma ise TGF- β 'da otokrin etkileşimin başlamasıdır. Yani TGF- β , HSH üzerinden kendi üretimini arttırmaya başlarsa fibrozis de başlar (58). TGF- β antagonistlerinin kullanımıyla, doku metalloproteinaz inhibitörlerinin ekspresyonunun azaldığı, interstisyel kollagenazların aktivitesinin ve matriks yıkımının arttığı gösterilmiştir (41,42,48, 60). TGF- β bilinen en kuvvetli fibrojenetik moleküldür ve bu molekülü kodlayan gende polimorfizm olması halinde, kişide fibrozis riski beş kat artar, ayrıca daha erken yaşta ve daha hızlı gelişir (61, 62).

TGF- β , hücre proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve ekstrasellüler matriks üretimini düzenleyen multifonksiyonel bir sitokindir. Normal hücrede apoptozu artırıp proliferasyonu azaltırken, transforme hücrede büyümeyi baskılama özelliğini yitirir. Bazı kanser tiplerinde, karsinogenezin erken dönemlerinde, tümör büyümesini baskımlarken; bazılarında geç dönemde kanser progresyonunu hızlandırır. Bu özelliklerine paralel olarak bazı kanser tiplerinde TGF- β reseptörlerinde mutasyon tanımlanmıştır ve tüm bu nedenlerle anti-kanser biyoterapisinin yeni gözdelelerinden birisidir (63, 64).

Fibrojenesis mekanizmaları oldukça aktif ve karmaşık süreçler olduğu gibi bu süreçte başı çeken hücreler şimdiki bilgilerimize göre HSH'ler iken, fibrozise neden olan myofibroblastik aktiviteye sahip başka hücrelerin de bu sürece katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu hücreler başta karaciğerin portal fibroblastları, kemik iliğinden gelen kök hücreler ya da dolaşımdaki fibrositler ile son yıllarda güncellenen ve araştırılmayı bekleyen epiteliyal mezenkimal dönüşüme uğrayan hücrelerdir. Karaciğerde epiteliyal mezenkimal dönüşüm gösteren hücreler hepatositler ve kolanjiyositlerdir (65,66) (Şekil 4).



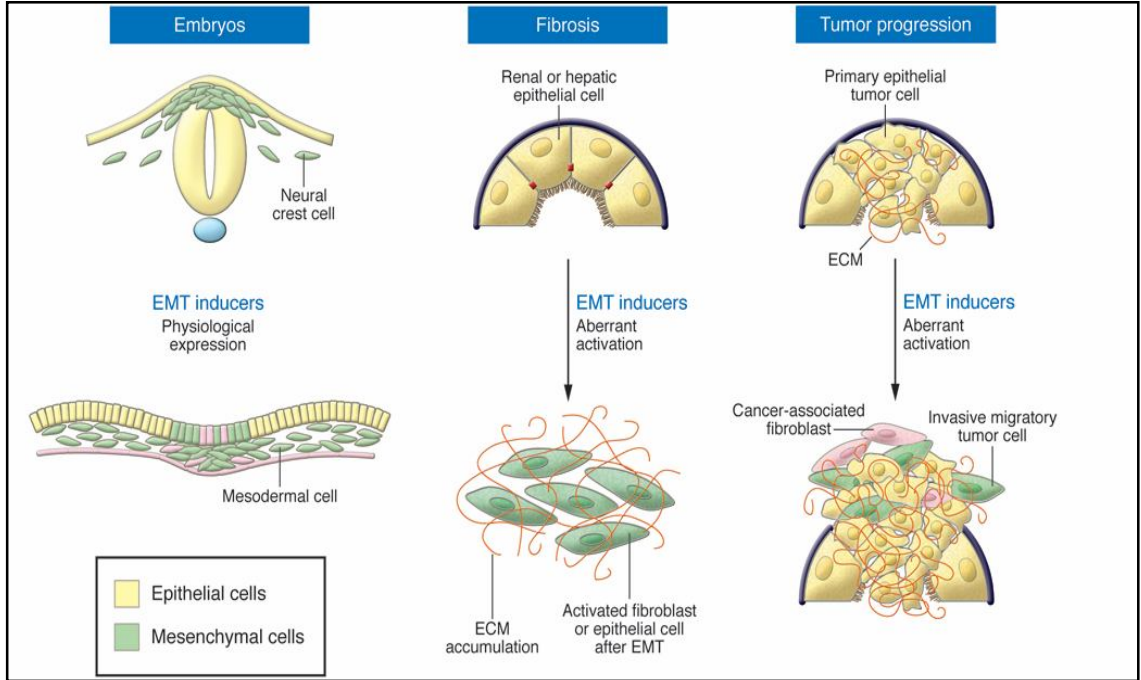
Şekil-4: Karaciğerdeki myofibroblastik aktivite gösteren hücrelerin kaynakları (66)

EPİTELİYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM

Epitelial mezenkimal dönüşüm (EMT) terimi ilk defa 1995 yılında Elizabeth Hay tarafından “Epitelial-mezenkimal tranformasyon” olarak tanımlanmıştır. Zamanla tranformasyon kelimesi yerine, olayın neoplastik bir süreç olmaması ve geri dönüşümlü olması nedeniyle transisyon (dönüşüm) terimi kullanılmıştır (66). EMT epitelial kökenli bir hücrenin zamanla mezenkimal özellik kazanmasıdır. EMT, embriyogenezis, embriyo transplantasyonu, organ gelişimi, tümör invazyonu ve metastazda önemli role sahiptir (65-83). Sadece karaciğerde değil böbrekte, akciğerde, fetal dokularda ve seröz membranlarda da tanımlanmıştır (69). Epitelial bir hücre zamanla mezenkimal özellik kazandığı gibi, bunun tersi de mümkündür yani

mezenkimal bir hücre epitelial bir hücreye de dönüşebilir. Bu “Mezenkimal Epitelial Dönüşüm” ise ilk defa böbrekte tanımlanmıştır (66).

EMT, in vivo olduğu gibi in vitro olarak da gösterilmiştir. Bu dönüşüm, epitelial bir hücrenin intersellüler bağlantılarını (E-kaderin) kaybedip, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile migrasyon yeteneği ve ekstrasellüler matriks proteinlerini salgılama yeteneği kazanması ile oluşur. Özellikle neoplastik hücrelerin migrasyon yeteneği kazanmasında, tümör invazyon ve metastazında önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (5). Epitelial hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümü, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, spesifik hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonu, hücre iskelet proteinlerinin ekspresyonu ve reorganizasyonu, ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezlenmesi ve spesifik mikro-RNA ekspresyonu gibi basamakları içeren moleküler değişiklikler ile ortaya çıkar. EMT'nin üç farklı subtipi tanımlanmıştır. Tip 1 EMT embriyo transplantasyonu ve embriyogenezde, Tip 2 organ fibrozisinde, Tip 3 ise tümör invazyon ve metastazında rol alır. Tip 2 EMT'nin özellikle karaciğer, böbrek ve akciğer gibi solid organların fibrozisinde etkili olduğu düşünülmektedir (66, 67).



Şekil-5: EMT'nin üç farklı subtipi (67)

EMT'ye uğrayan hücrelerde, epiteliyal hücreler için spesifik moleküller olan sitokeratin ve E-kaderin yerini zamanla motilite yeteneği kazanmış mezenkimal hücre tarafından sentezlenen ekstrasellüler matriks proteinlerine bırakır. Bu arada her iki fonsiyona sahip ara hücrelere “parsiyel EMT'ye uğramış” hücreler denir (68). Erişkin insan karaciğerinde iki hücre tipinin epiteliyal mezenkimal dönüşüme uğradığı düşünülmektedir; hepatositler ve kolanjiyositler.

Hasara uğrayan karaciğerde, hasarla birlikte monosit ve makrofajlardan salgılanan TGF β 1, fibrojenik myofibroblastların aktivasyonunda kritik öneme sahiptir. Hepatik myofibroblastlar proliferatif yeteneği yüksek, profibrojenik, proinflamatuvar, proanjyogenik ve kontraktıl hücreler olup tip I kollagen üretirler ve diğer ekstrasellüler matriks proteinleri gibi fibröz skar oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücrelerin kökeninde daha önce anlatıldığı gibi HSH'lerin veya portal alandaki fibroblastların transdiferansiasyonu ve aktivasyonunun yer aldığı öngörülse de kemik iliği kökenli mezenkimal kök

hücrelerin de katkısı olduğu düşünülmektedir. Bir başka yol ise hepatosit ya da kolanjiyositlerin epitelial mezenkimal dönüşüme uğramasıdır. Epitelial mezenkimal dönüşüm sürecinde, bozulmuş olan TGF- β regülasyonuna bağlı olarak hepatosit sitoplazmik membranındaki E-kaderin dağılımı ve fonksiyonları bozulur. Epitelial hücrelerin intersellüler bağlantıları etkilenir ve hepatosit komşusu olan diğer hepatositler yerine, integrinler aracılığıyla mezenkimal hücrelere tutunur. İşte bu basamaklarla eskiden bir epitel gibi davranan hücrenin bir mezenkimal hücre gibi fonksiyon gördüğü ve böylece fibrozis sürecine katıldığı ileri sürülmektedir (5).

EMT ile ilgili hala bilinmeyen kilit noktaların yapılacak çalışmalarla ve özellikle de fare modelleri ve moleküler çalışmalarla çözümlenmesi beklenmektedir. EMT'de tetiği çeken mekanizmalar, sinyal yollarının ayrıntıları ve bu tür sinyallere hücreleri duyarlı kılan nedenler nelerdir? Sonuç olarak tüm bu sürece ait kanıtlar ve EMT'nin fibrozis ve bunun sonucu gelişen siroza ne denli katkısı olduğu halen araştırılması gereken bir konudur (84-86).

α - DÜZ KAS AKTİNİ

İskelet proteinlerinden mikroflament sistemine ait olan aktin, ökaryotik canlılarda bulunan en önemli, globüler sitoplazmik proteinlerdir. 42kDa molekül ağırlığındadır. Aktin proteinin 6 tane izoformu vardır bunlar iskelet kası, kalp kası ve düz kaslar gibi farklı dokularda bulunur. α - düz kas aktini normalde karaciğerde, damar düz kaslarında ve aktive olmuş Stellat hücrelerin sitoplazmalarında eksprese edilir ve myofibroblastik aktiviteyi gösterir (87-89). Çalışmamızda α - düz kas aktini, HSH aktivasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

FİBROBLAST SPESİFİK PROTEİN-S100A4

Fibroblast Spesifik Faktör, S100A4 olarak da bilinir. 10-12kDa moleköl ağırlığında olan S100A4, S100 ailesinin bir alt grubudur. S100 ise kalsiyum bağlayıcı proteindir ve ismi amonyum sülfat solüsyonunda %100 çözünür olmasından gelir. Karaciğerde fibroblastlar tarafından eksprese edildiği gibi T lenfositler, plazma hücreleri ve Kupffer hücreleri gibi yangı hücrelerinin sitoplazmalarında eksprese edilir (90,91). Çalışmamızda bu antikoru, karaciğer fibrozisi ile ilişkisini ve rolünü değerlendirmek amacıyla kullandık.

KOLLAGEN TİP I

Glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinden biridir. Üç adet polipeptid alfa zincirinin üçlü sarmalından oluşur. Günümüzde 27 farklı kollagen tipi bilinmektedir. Tip I, II, III, V ve XI interstisiyel ya da fibriler kollagenlerdir ve en fazla miktarda bulunan tiplerdir. Tip IV fibriller yerine tabakalar yapar (non-fibriler). Diğer kollagenler ağ örgüsü oluşturabilirler ve epidermal-dermal bileşkelerde, kıkırdakta ve kan damarlarının duvarlarında birleştirici olarak görev yapar. Fibriler kollagen, preprokollagen denen prekürsör molekülden sentezlenir. Prolin ve lizin artıklarının hidroksilasyonunu ve lizinin glikolizasyonunu takiben, üç prokollagen zinciri üçlü sarmal yapıyı oluşturma aşaması için sıraya dizilir. Kollagen fibril oluşumu, spesifik lizin ve hidroksilizin artıklarının lizil oksidaz ile oksidasyonu sonucu çapraz bağlanmalar meydana gelir ve böylece kollagenin karakteristiği olan dizilim sağlamlaştırılır. Karaciğerde tip I kollagen refraktil matür kollagen olup portal alanın matriksinde ve hepatik ven duvarlarında yer alır. Karaciğerde siroza gidişte HSH'ler tarafından sentezi artar (5).

E-KADERİN

E-Kaderin, hücre-hücre, hücre-matriks adezyonu, normal doku yapısının oluşması ve bütünlüğünün sağlanmasında, organ gelişiminde, yangısal olaylarda, kanser invazyonu ve metastazında önemli bir role sahiptir (66). Kaderinler kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumlu transmembran glikoprotein ailesidir. Bu ailenin 30'dan fazla üyesi vardır. Klasik kaderin tip I olarak adlandırılan E, P ve N-kaderin ilk tanımlanan kaderinlerdir. Kaderinler sitoplazmada 5 tekrarlayan alt birim, bir transmembran bölge ve karboksiterminal bölgeyi içeren ekstrasellüler bölgeden oluşmaktadır. Klasik kaderinlerin sitoplazmik kısmı kateninleri bağlar. E-kaderin 16. kromozomun uzun kolunda lokalizedir ve 120 kDa molekül ağırlığındadır. Hücreler arası sıkı bağlantıları sağlayan zonula adherans bölgesinde yerleşmiştir. Epitelial hücreler arasında kalsiyum bağımlı adezyonun sürdürülmesinde anahtar rol oynayan E-kaderinin bu fonksiyonu katenin olarak adlandırılan sitoplazmik proteinlere bağımlıdır. Kateninler E-kaderini hücre iskeletine bağlamaktadır. E-kaderinde mutasyon, hücre adezyonunda azalmaya neden olmaktadır. Normal epitelial hücrelerin hücre membranında E-kaderin ve katenin ekspresyonu vardır. Bir çok tümörde E-kaderin ekspresyonunda azalmanın yüksek derece ve ileri evre ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (92,93). Çalışmamızda E-kaderini epitelial bir belirleyici olarak seçmemizin nedeni sitokeratinler gibi sitoplazmik bir boyanma değil membranöz boyanma sergilemesidir.

Çalışmamızda karaciğerde fibrozise neden olan etkenlerin başında gelen, fibrojenik bir sitokin olan TGF- β , fibrogenesis sürecine katkısını anlamak amacıyla uygulandı. Bu sürecin ana basamaklarda aktif rol oynayan, myofibroblastik aktivitesi bulunan aktive HSH'leri göstermek için alfa-düz kas aktini, fibroblastların gösterilmesi için ise FSP-S10A4A4 çalışıldı. Ekstrasellüler matriks proteinlerinden kollagen tip I'i sentezleyen HSH'ler yanı sıra epitelial bir belirteç olan E-kaderin ile kollagen tip I'i aynı anda eksprese

eden epiteliyal mezenkimal dönüşüme uğradığı düşünülen hepatositlerin varlığı da araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

OLGULAR

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan, 1999-2012 yılları arasında karaciğer biopsi materyallerinde tanı almış 70 kronik hepatit olgusu değerlendirildi. Bu olguların Ishak skoruna göre fibrozis derecesi 0 ile 6 arasında değişmekteydi. Her fibrozis evresi için 10'ar adet olmak üzere toplam 70 olgunun hematoksilin&eozen (H&E) boyalı preparatları ve blokları seçildi. Histokimyasal boyalar eşliğinde tekrar değerlendirilerek tanıları doğrulandı. Olguların tümü HBV veya HCV olmak üzere viral hepatitli hastalardı. Hastalarda ayrıca diğer kronik hepatit nedenleri (ilaç veya alkol kullanımı, toksik nedenler, metabolik hastalık, safra duktus hastalıkları vs.) dışlandı. Blok seçiminde yeterli doku olmasına dikkat edildi. Ayrıca başka nedenlerle çıkarılmış (tümör, kist hidatik vs) karaciğer eksizyonel biopsilerindeki olağan karaciğer dokusu alanlarından 20 olgu, kontrol grubu olarak çalışıldı. Olgulara daha önce uygulanan histokimyasal boyalardan Masson trikrom ve retikulum boyalarıyla immunohistokimyasal boyalardan HBsAg boyası tekrar değerlendirildi ve rutinde kullanılan bu belirleyicilerden eksik olanları tamamlandı. Tüm olgulara myofibroblastik (HSH oranı) aktiviteyi değerlendirmek üzere α -düz kas aktini, fibroblastik aktiviteyi değerlendirmek üzere FSP-S10A4A4 ile fibrojenik bir sitokin olan TGF β immunohistokimyasal boyamaları uygulandı. Ayrıca sitoplazmik boyanan Kollagen tip I ile membranöz boyanan E-kaderin antikorları dual immunohistokimya yöntemi ile uygulanarak, bu iki primer antikor aynı anda eksprese eden hücrelerin varlığı araştırıldı.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Formalin tespitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen dört mikron kalınlığındaki kesitler pozitif elektrik yüklü lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 60°C'lık etüvde ortalama 2 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Elde edilen tüm kesitlere aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilen α -düz kas aktini, FSP-S10A4A4 ve TGF β immunohistokimyasal boyaları uygulandı (Tablo 4). Bu immunohistokimyasal boyalardan TGF β uygulanan preparatlar hariç diğer preparatlar deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm boyama işlemleri için tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark, XT İHC/ISH) yerleştirildi. İHK boyamalar için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı. Primer antikorlar için antijen açığa çıkarmak amacıyla "CC1 mild" ön işlemi seçildi ve 37°C'de inkübe edildi. Primer antikorlar manuel olarak damlatıldı. Zemin boyanmasını engellemek amacıyla "A/B Block" işlemi seçildi. Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan (GBL^R GulmountTM PAX, Örtme Ortamı PA) ile kapatıldı.

Anti-TGF β 1 antikoru elde boyama yöntemi ile aşağıda tarif edilen şekliyle yapıldı:

Kesitler 37 °C'lık etüvde 1 gece bekletildi. Etüvden çıkarır çıkarmaz bekletmeden veya soğutmadan hemen ksilene alındı. İki ayrı taze ksilende 5'er dk inkübasyon yapıldı. Daha sonra derecesi azalan alkollerden, her birinde 5'er dk olacak şekilde geçirilerek rehidrate edildi. Distile suda yıkanarak İHK boyama işlemine geçildi. Önce mikrodalga fırında sitrat tampon (pH 6) solüsyonunda 20 dk kaynatıldı. İşlem sırasında azalan

solüsyon seviyesi kontrol edilerek eksilen sitrat tampon ilave edildi. Laboratuvarımızda eritme aşamasından (mikrodalgadaki 2. seviye) itibaren 4 ayrı aşamada 5'er dk kaynatma yapıldı. Isı uygulaması bittikten sonra kesitler sitrat içinde, oda ısısında 20-30 dk soğumaları için bekletildi. PBS içinde 2 kez 5'er dk yıkandı. Pap Pen ile dokuların etrafı çizilerek oda ısısında 15 dk peroksidaz blok uygulandı. Bu aşamadan itibaren dokuların kurumamaları için işlemleri kapaklı İHK kabı içinde yapıldı. Protein blok ile oda ısısında 15 dk inkübasyonun ardından primer antikör inkübasyonuna geçildi. Antibody dilüent ile dilüe edilmiş antikörden mikropipet ile 50 mikrolitre çekilerek doku kesitlerinin her birine 50 mikrolitre uygulandı ve kesitler +4 derecede/buzdolabında en az 12 saat inkübe edildi (1/50 dilüsyonla çalışıldı). PBS ile 3 kez 5 dk yıkama yapıldı. Biotin bağlı sekonder antikör ve ardından Streptavidin HRP oda ısısında 30'ar dk uygulandı. Her ara aşamada tekrar PBS ile 2 kez 5 dk yıkama yapıldı. Daha sonra DAB ve ardından da DAB enhancer ile 5-15 dk oda ısısında inkübasyon uygulandı. Gözle kahverengileşme izlenir izlenmez DAB kromojenin iyice temizlenmesi için kesitler yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilinle zıt boyama boyama uygulanarak alkol serileri ile dehidrasyon işlemi tamamlandı. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan ile preparatlar kapatıldı.

DUAL İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Formalin tespitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen dört mikron kalınlığındaki kesitler pozitif elektrik yüklü lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 60°C'lık etüvde ortalama 2 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Elde edilen tüm kesitlere aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilen Kollagen tip I ve E-Kaderin immunohistokimyasal boyaları uygulandı (Tablo 4). Dual boyama yapılacak 90 preparat deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK boyama işlemleri için tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana,

Benchmark, XT İHC/ISH) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

Her iki antikor için antijen açığa çıkarma amacıyla “CC1 mild” ön işlemi seçildi ve 37°C’de inkübe edildi. Bu yöntemle çalışılan membranöz bir belirleyici olan E-Kaderin ilk antikor olarak DAB Detection Kit ile, sitoplazmik belirleyici olan Kollagen tip I ise ikinci antikor olarak Red Detection kit ile boyandı. Önce boyanan antikor olan E-Kaderin’in inkübasyon süresi dolduktan sonra ikinci antikor olan Kollagen tip I manuel olarak damlatıldı. Epitelial belirleyici olarak sitokeratinlerin tercih edilmemesinin nedeni sitoplazmik boyanma sergiliyor olmasıydı. Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan (GBL^R GulmountTM PAX, Örtme Ortamı PA) ile kapatıldı.

Tablo 4: Primer antikorlara ilişkin İHK boyama yöntemi ayrıntıları

Primer Antikor/Clone	Ambalaj	Katalog no	Marka	Dilüsyon oranı/ inkübas-yon süresi	Pozitif kontrol
Anti-TGF- β 1 antibody (2Ar2)	0.1ml konsantre	Ab64715	ABCCAM Inc. CambridgeMAUSA	1/50 12 saat +4 derece	Plasenta dokusu
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Aktin (1A4)	12 ml kullanıma hazır	IR 611	DakoCytomation Denmark A/S, Denmark	12 dk oda ısısı	Olağan kolon dokusundaki muskularis mukoza ve propria alanları
Polyclonal Rabbit Anti-human S100A4 (A13)	1 ml konsantre	A5114	DakoCytomation Denmark A/S, Denmark	1/100 8 dk	Olağan tonsil dokusu
Anti-collagen I antibody	0.1ml konsantre	Ab34710	ABCCAM Inc. Cambridge, MA, USA	1/100 20 dk	Sirotik karaciğer dokusu
Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin (NCH-38)	12 ml Kullanıma hazır	IR059	DakoCytomation Denmark A/S,Denmark	44 dk	Olağan meme dokusu

İMMUNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı. Boyanma yoğunlukları ve oranları iki çalışmacı tarafından (TK ve SA) görüşbirliğine varılarak saptandı.

α -düz kas aktini kontrol grubunda ve normalde, karaciğerde portal alanlardaki damar düz kaslarını boyar. Parankim içinde herhangi bir boyanma sergilemez. HSH'ler ise kendilerine "karaciğere spesifik perisit" denmesine yol açacak şekilde sinuzoidlerin kenarında yer alırlar ve ışık mikroskopik değerlendirmede görülmezler. Ancak aktive olduklarında α -düz kas aktini ile boyanırlar. Bizim çalışma grubumuzda fibrozis evresi 0-1-2-3-4-5-6 olan olgularda α -düz kas aktini ekspresyonu fibröz septa ve periportal parankimal alanlarda değerlendirildi. Siroz olgularında da fibröz septa ve sirotik nodül içinde aktive HSH boyanma oranı ve yoğunluğuna bakıldı. Boyama skoru değerlendirilmesi ise şu şekilde yapıldı:

- 0 (negatif): Boyanma olmaması veya alanın %3'den azında boyanma olması
- +1 (hafif): 10'luk büyütmede alanın %3-33'lük bölümünde boyanma olması
- +2 (orta): 10'luk büyütmede alanın %33-66'lık bölümünde boyanma olması
- +3 (şiddetli): 10'luk büyütmede alanın %66'sından fazlasında boyanma olması

TGF- β normalde büyüme ve diferansiasyona uğramış hücreler tarafından eksprese edilir. Özellikle aktif kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerde ve plasenta dokusunda trofoblastlarda ekspresyonu daha fazladır. Karaciğerde ise sirozun çeşitli aşamalarındaki hepatositlerde ve kolanjiyositlerde boyanma sergiler. Olgularımızda TGF- β ekspresyonu değerlendirilirken özellikle periportal alanlarda daha fazla olmak üzere

parankim içindeki hepatositlerin boyanma oranına ve yoğunluğuna bakıldı. Hepatositlerin ve kolanjiyositlerin sitoplazmalarındaki granüler boyanma, pozitif olarak değerlendirildi. Boyama skoru değerlendirilmesi ise şu şekilde yapıldı:

- 0 (negatif): Boyanma olmaması veya alanın %3'den azında boyanma olması
- +1 (hafif): 10'luk büyütmede alanın %3-33'lük bölümünde boyanma olması
- +2 (orta): 10'luk büyütmede alanın %33-66'lık bölümünde boyanma olması
- +3 (şiddetli): 10'luk büyütmede alanın %66'sından fazlasında boyanma olması

FSP-S100A4 kontrol olgularında ve tonsil dokusunda lenfositler, plazma hücreleri ve karaciğerde Kupffer hücreleri tarafından eksprese edilir. Olgularımızda portal alanlar içinde ve çevresindeki fibroblastlar ile sinuzoidler içindeki Kupffer hücreleri değerlendirildi. FSP-S100A4 lenfositler tarafından da eksprese edildiği için hücrenin şekline ve yerleşimine bakılarak yangı hücreleri ile ayrımı yapıldı. Yuvarlak şekilli hücreler lenfosit, iğsi olanlar ise fibroblast olarak değerlendirildi. Boyanan fibroblastların yoğunluğuna ve yukarıda tanımlanan oranlara göre 0-1-2-3 şeklinde skorlama yapıldı.

DUAL İMMUNOHİSTOKİMYA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dual immunohistokimya yöntemiyle hepatositlerde, kollagen tip I sitoplazmik, kırmızı renkte boyanırken, E-kaderin kahverengi, ince membranöz boyanma sergiledi. Özellikle periportal alanlarda başta olmak üzere fibröz bantlar çevresinde ve parankim içinde sitoplazmik-kırmızı ve kahverengi-membranöz boyanmayı birlikte gösteren hepatositler (EMT'a uğramakta olan) değerlendirildi. Hücre membranı üzerinde olmayan,

sitoplazmada olduğu net olarak seçilen, kırmızı renkli kollagen globüllerine sahip membranı kahverenkli hepatositler pozitif hücreler olarak yorumlandı. Boyanma şiddeti ve yoğunluğu aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

- 0 (negatif): Boyanma olmaması
- +1 (hafif): 40'lık büyütmede periportal-periseptal hepatositlerde az oranda boyanma
- +2 (orta): 40'lık büyütmede periportal-periseptal hepatositlerde yoğun boyanma

Ayrıca portal alanlardaki tüm safra duktusları da EMT gösterdikleri için dual boyanma açısından incelendi. Kolanjiyositlerde yalnızca E-kaderin ile kahverenkli membranöz boyanma izlenirken, E-kaderin+Kollagen tip I ekspresyonu yapan kolanjiyositler hiçbir olguda görülmedi.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 15.0 versiyonu ve korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Sonuçların istatistiksel yöntemlerle incelenmesinde $p < 0.05$ olduğunda anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olguların Cinsiyet / Yaş Dağılımı ve Viral Serolojisi

Çalışmaya alınan olguların 42'si (%60) erkek, 28'i (%40) kadındı. Cinsiyet dağılımı Tablo 5'te gösterildi.

Tablo 5: Olguların cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Olgu Sayısı (n)	%
Kadın	28	40
Erkek	42	60
Toplam	70	100

Olguların yaşları 11 ile 77 arasında değişmekte olup ortalama yaş 42,1 yıl idi. Yaşla cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki görülmedi. Olguların yaş dağılımı Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6: Olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları (yıl)	Olgu Sayısı (n)	%
0-19	4	6
20-29	15	21
30-39	11	16
40-49	16	23
50-59	13	18
60-69	7	10
70-79	4	6
Toplam	70	100

Olguların 54'ü HBV, 16'sı HCV pozitif idi. Olguların viral seroloji bulgularına göre dağılımı Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7: Olguların HBV ve HCV pozitifliği

Hepatit Viral Serolojisi	Olgu Sayısı (n)	%
HBV pozitif	54	77
HCV pozitif	16	23
Toplam	70	100

Hastalardan alınan karaciğer biopsilerinin 61'i kalın iğne, 9'u kama biopsisi şeklindeydi.

Kontrol grubu ise yaşları 1 ve 52 arasında değişen, viral serolojik bulguları negatif, hepatit dışı nedenlerle insizyonel biopsi uygulanmış, histolojik olarak “olağan” görünümüne sahip 20 olgudan oluşmaktaydı. Kontrol grubunun 14'ü kalın iğne, 6'sı kama biopsisiydi.

Olguların Histopatolojik Sonuçları

Ishak skoruna göre tüm olgularımızda HAI değerlendirildi. Aktivite derecesi 1-4: minimal, derece 5-8: hafif, derece 9-12: orta ve derece 13-18: Şiddetli nekro-inflamatuvar aktivite olarak tanımlandı. 0: negatif olarak değerlendirildi. Bizim olgularımızda aktivitenin modifiye derecelendirmesi 3 ile 16 arasında değişmekteydi. Olguların aktivite derecesine göre dağılımı Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8: Olguların Ishak aktivite derecesine göre dağılımları

Aktivite Derecesi	Olgu Sayısı (n)	%
0-4 minimal	6	8,5
5-8 hafif	21	30
9-12 orta	27	38
13-18 şiddetli	16	23,5
Toplam	70	100

Çalışmamızda Ishak skoruna göre fibrozis düzeyi 0 ile 6 arasında değişen ve her gruptan 10'ar olmak üzere toplam 70 olgu bulunuyordu.

Olguların İHK Sonuçları

Düz kas aktini ile 22 (%31) olguda hiç boyanma saptanmadı. Boyanmayan bu olgular fibrozis evresi 0, 1, ve 2 olan grupta yer almaktaydı. 22 (%31) olguda ise 3+ boyanma görüldü. 3+ boyananlar fibrozis evresi 3, 4 ve 5 olan gruptan olguları ve evresi 6 olan grubun tamamını kapsamaktaydı. Periportal alanlardan başlayarak parankimde sinuzoidler içerisinde yer alan ve periseptal bölgeye kadar uzanım gösteren, aktive olmuş HSH sitoplazmalarındaki boyanma pozitif kabul edildi. Düz kas aktini ile olguların boyanma skorlarına göre dağılımı ve yüzdeleri Tablo 9'da görülmektedir.

Tablo 9: Olguların düz kas aktini boyanma skorlarına göre dağılımı

Boyanma Skoru	Düz Kas Aktini (+) Olgu Sayısı (n)	%
0	22	31,4
1	15	21,2
2	11	16
3	22	31,4
Toplam	70	100

Kontrol grubunda, portal alandaki damar düz kasları dışında parankim içinde herhangi bir boyanma izlenmedi.

Fibrozis evresine göre olguların düz kas aktini boyanma oranı Tablo 10'da verilmektedir. Tabloda görüldüğü gibi fibrozis evresi ile HSH'lerdeki düz kas aktini ekspresyon yoğunluğu arasında pozitif korelasyon bulunuyordu. Bu durum istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p=0,01$).

Tablo 10: Olguların fibrozis evresine göre düz kas aktini boyanma oranı

Evre	Düz Kas Aktini (+)	Düz Kas Aktini (-)
0	(-)	10
1	3	7
2	5	5
3	10	(-)
4	10	(-)
5	10	(-)
6	10	(-)

TGF- β ile 20 (%28) olguda hiç boyanma görülmedi. TGF- β ekspresyonunun olmadığı bu olgular fibrozis evresi 0 ve 1 olan grupta yer almaktaydı. 17 (%24) olguda ise 3+ boyanma izlendi. 3+ olguların tümü fibrozis evresi 5 ve 6 olan gruptaydı. TGF- β ile olguların boyanma skorlarına göre dağılımı ve yüzdeleri Tablo 11’de verilmektedir. Olgularımızda hepatositlerde sitoplazmik, granüler boyanma boyanma pozitif kabul edildi. Boyanmanın yoğunluğu periportal alanlardaki hepatositler başta olmak üzere tüm parankimde artmış görünümdeydi. Safra duktuslarında da TGF- β ekspresyonu izlendi ancak kolanjiyositlerdeki bu ekspresyon ile fibrozis düzeyi ve yoğunluğu arasında herhangi bir ilişki görülmedi.

Tablo 11: Olguların TGF- β ile boyanma skorlarına göre dağılımı

TGF-β Boyanma Skoru	Olgu Sayısı (n)	%
0	20	28,6
1	17	24,3
2	16	22,8
3	17	24,3
Toplam	70	100

Fibrozis evresi ile olguların TGF- β boyanma durumu Tablo 12’de verilmektedir. Görüldüğü gibi fibrozis evresi arttıkça TGF- β ekspresyonu da artmaktaydı. Buna bağlı olarak fibrozis evresi ile hepatositlerdeki TGF- β ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p=0,01$).

Tablo 12: Olguların fibrozis evresi ile TGF- β boyanma durumu

Evre	TGF-β (+)	TGF-β (-)
0	(-)	10
1	1	9
2	9	1
3	10	(-)
4	10	(-)
5	10	(-)
6	10	(-)

Kontrol grubunda TGF- β ile sadece olağan safra duktuslarında boyanma izlenirken gerek periportal, gerekse periseptal alanlardaki hepatositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi .

FSP-S100A4 ile 4 (%6) olguda boyanma saptanmadı ve boyanmayan bu olguların tamamı fibrozis evresi “0” olan grupta yer alıyordu. 32 (%46) olguda 3+ boyanma saptandı. Bu olgular ise fibrozis evresi 4 olan grubun bir kısmını ve fibrozis evresi 5 ve 6 olan grubun tamamını kapsamaktaydı. FSP-S100A4’ün lenfosit, plazma hücreleri ve makrofaj kökenli Kupffer hücrelerini de boyadığı görüldü. Bu nedenle fibroblastlara spesifik olmayan bu antikorun değerlendirmesinde fibroblastik aktivasyona karar vermek için hücrenin iğsi şekilli olması kriter alındı. Ancak nekro-inflamatuar aktivitenin artışı ile birlikte özellikle portal alanlarda yoğunlaşan yangı hücreleri değerlendirmeyi zorlaştırdı. Bu alanlardaki yuvarlak nükleuslu hücreler yangı hücreleri, periportal alanda yer alan iğsi şekilli hücreler ise fibroblastlar olarak kabul edildi. FSP-S100A4 boyanması için portal ve periportal alanlar değerlendirmeye alındığı için sinuzoidal yerleşimli Kupffer hücreleri daha az sorun yarattı. FSP-S100A4 ile olguların boyanma skorlarına göre dağılımı ve yüzdeleri Tablo 13’de verilmektedir.

Tablo 13: Olguların FSP-S100A4 boyanma skorlarına göre dağılımı

FSP-S100A4 Boyanma Skoru	Olgu Sayısı (n)	%
0	4	5
1	9	13
2	25	36
3	32	46
Toplam	70	100

Fibrozis evresi ile olguların FSP-S100A4 boyanma durumu Tablo 14’de verilmektedir. Fibrozis evresi ile FSP-S100A4 arasında istatistiksel olarak da doğrulanan pozitif korelasyon bulunuyordu ($p=0,01$).

Tablo 14: Olguların fibrozis evresi ile FSP-S100A4 boyanma durumu

Evre	FSP-S100A4 (+)	FSP-S100A4 (-)
0	6	4
1	10	(-)
2	10	(-)
3	10	(-)
4	10	(-)
5	10	(-)
6	10	(-)

Kontrol grubunda FSP-S100A4 ile 5 olguda portal alanda tek tük lenfosit boyanması yanı sıra portal alanın periferindeki iğsi şekilli fibroblastlar ve sinuzoidler içindeki Kupffer hücrelerinde de boyanma saptandı. Bu olgular 1+ FSP-S100A4 pozitifliği olarak değerlendirildi ve fibroblastik aktivasyonun bir göstergesi olarak yorumlandı.

Dual antikorların (E-kaderin + Kollagen Tip I) boyanma özellikleri:

Olguların 38'inde (%54) Kollagen Tip I açısından hiç boyanma saptanmazken, 27 (%38,9) olguda 1+, 5 (% 7,1) olguda 2+ boyanma saptandı. Değerlendirme ışık mikroskopunda x40 büyütme ile yapıldı. Değerlendirmede hepatosit membranı üzerinde bulunmayan, mutlak olarak sitoplazmada yerleşmiş, parlak globüler boyanma Kollagen Tip I açısından pozitif kabul edildi. Pozitif kabul edilen bu hücreler periportal bölgede daha fazla olmak üzere periseptal bölgeye de uzanım göstermekteydi. Fibrozis evresi arttıkça Kollagen Tip I ekspresyonunda belirgin bir artış olduğu dikkati çekti. Hem periportal hem periseptal bölgede bulunan ve her iki antikor aynı anda eksprese eden hepatositler şiddetli boyanma olarak değerlendirildi. Değerlendirmenin objektif olabilmesi için Kollagen Tip I yoğunluğu hafif (1+) ve şiddetli (2+) olarak iki kategoride yapıldı. Kollagen Tip I eksprese eden hepatosit fenotipindeki hücrelerin hiç birisinde E-kaderin ekspresyon kaybı gözlenmedi. Çalışmamızda E-kaderin+Kollagen Tip I dual ekspresyonu gösteren, hepatosit fenotipine sahip hücreler bulunan olguların boyanma oranları Tablo 15'de verilmektedir.

Tablo 15: Olguların E-kaderin + Kollagen Tip I boyanma oranları

E-kaderin+Kollagen Tip I	Olgu sayısı (n)	%
0	38	54
1	27	38,9
2	5	7,1
Toplam	70	100

Kontrol grubundaki olguların hiç birisinde E-kaderin ve Kollagen Tip I'i birlikte eksprese eden hepatosit ya da kolanjiyosit görülmedi.

İmmunohistokimyasal Sonuçların Birbirleri ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkisi:

Yaş ve cinsiyet ile çalışılan belirleyiciler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

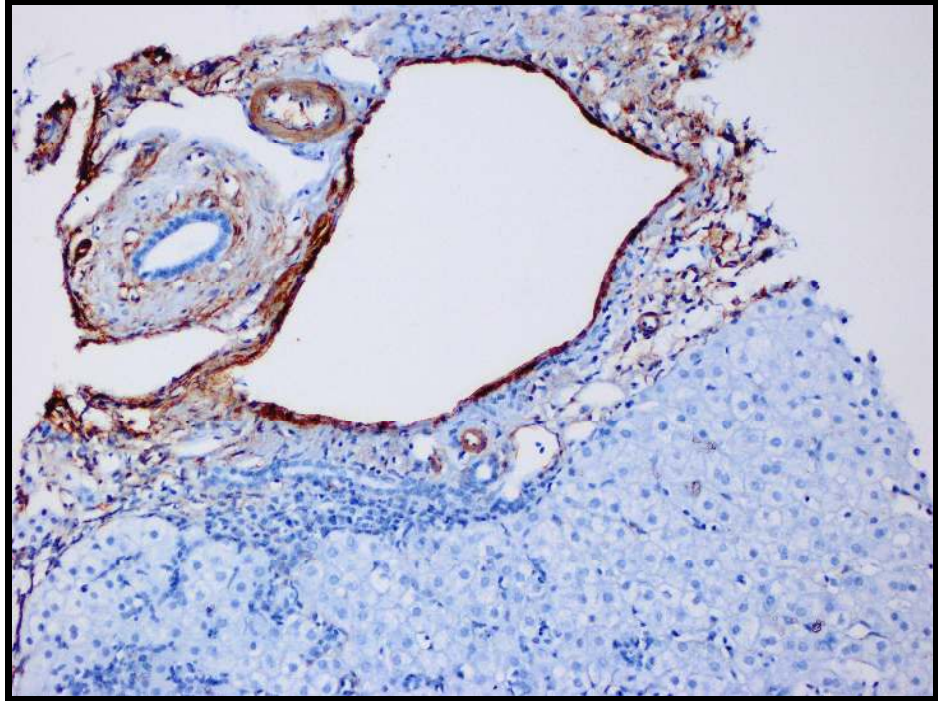
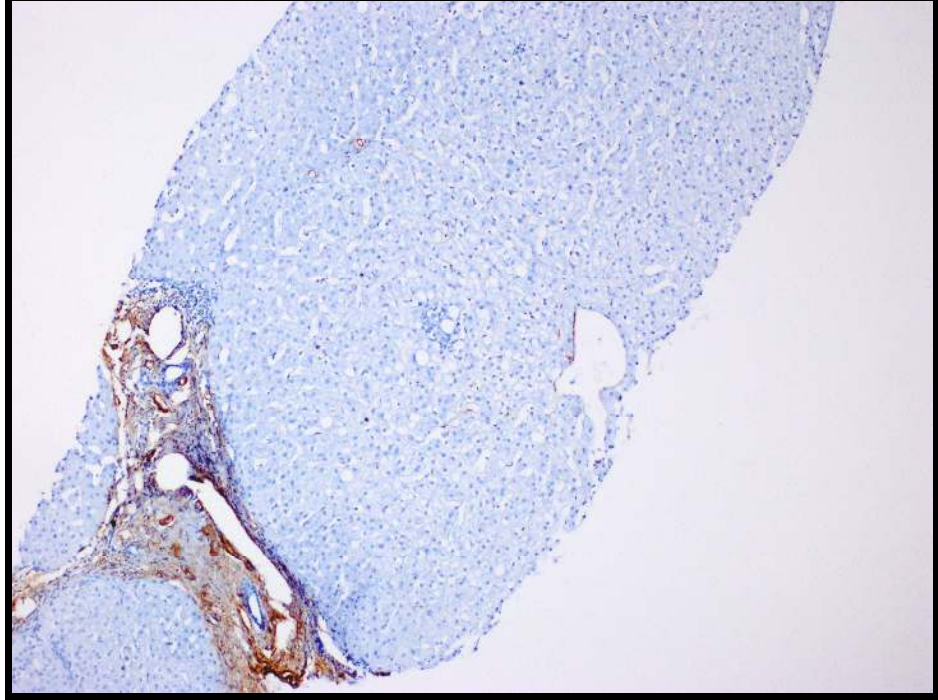
İstatistiksel çalışmalar sonunda aralarında anlamlı ilişki çıkan parametreler ve bu ilişkilerin ortaya çıkardığı sonuçlar Tablo 16'da özetlenmektedir.

Tablo 16: Aralarında anlamlı ilişki olduğu ortaya konan parametreler ve elde edilen sonuçlar

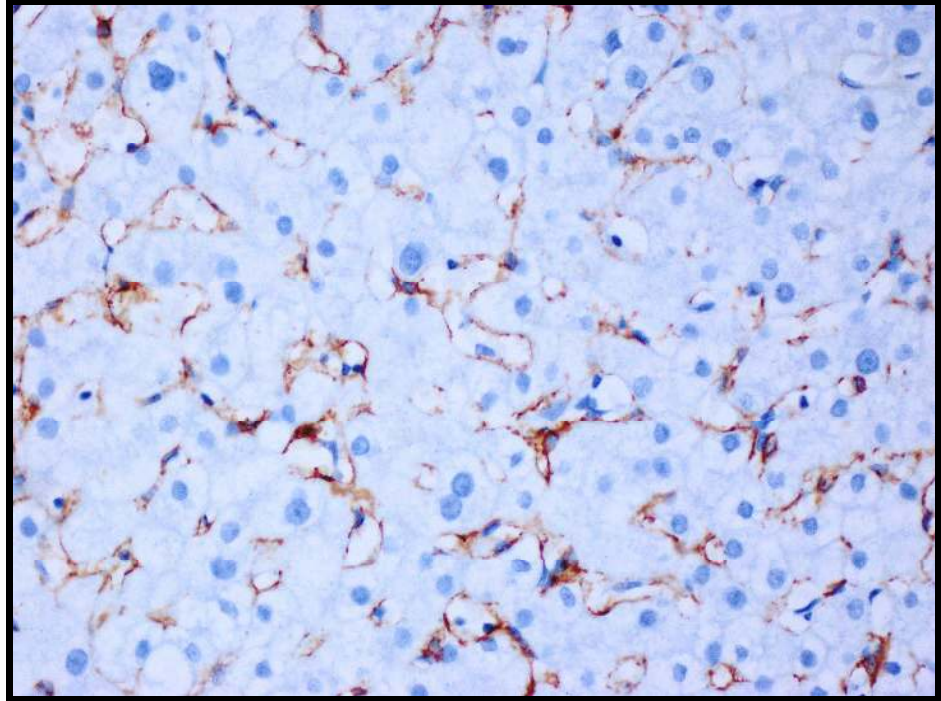
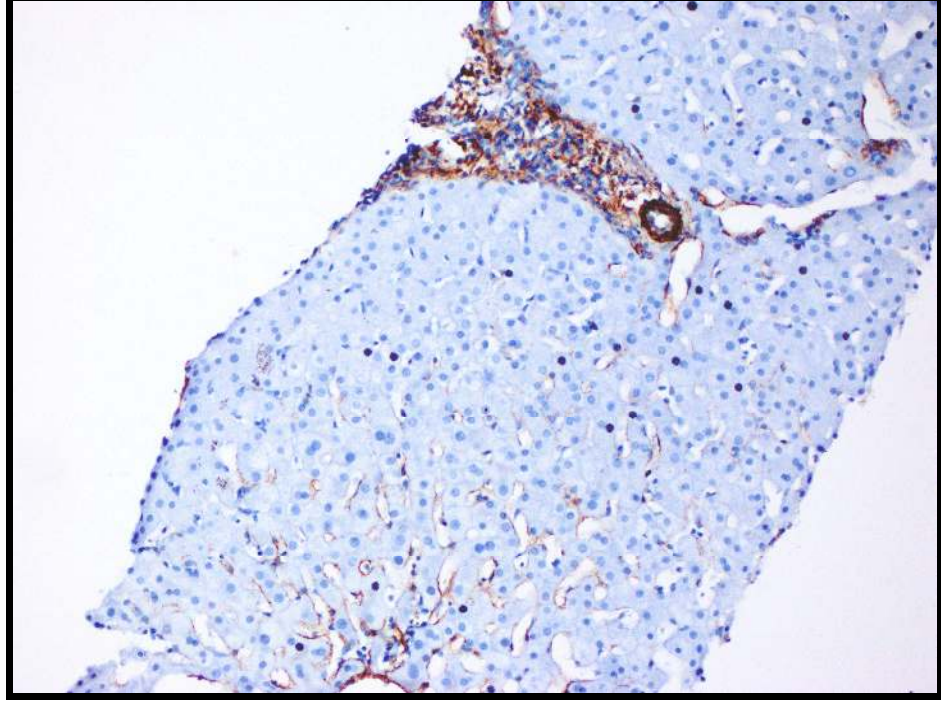
Parametreler/Sonuç	P değeri
Fibrozis düzeyi ile düz kas aktini arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
Fibrozis düzeyi ile FSP-S100A4 arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
Fibrozis düzeyi ile TGF- β arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
Fibrozis düzeyi ile E-kaderin+Kollagen Tip I dual boyanması arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
Nekro-inflamatuar aktivite derecesi ile düz kas aktini arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01

Nekro-inflamatuar aktivite derecesi ile FSP-S100A4 arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
Nekro-inflamatuar aktivite derecesi ile TGF- β arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
HCV pozitif hastalarda HBV pozitif hastalara göre düz kas aktini ekspresyonu anlamlılık sınırında pozitif korelasyon gösterdi	0,05
HCV pozitif hastalarda HBV pozitif hastalara göre TGF- β ekspresyonu açısından pozitif korelasyon saptandı	0.01
HCV pozitif hastalarda HBV pozitif hastalara göre E-kaderin+Kollagen Tip I boyanması arasında pozitif korelasyon saptandı	0,034
Nekro-inflamatuar aktivite derecesi ile viral hepatit tipi arasında korelasyon görülmezken HCV pozitif hastalarda HBV pozitif hastalara göre fibrozis evresi açısından pozitif korelasyon saptandı	0.012
Düz kas aktini ile FSP-S100A4, TGF- β ve E-kaderin+Kollagen Tip I dual boyanması arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01
FSP-S100A4 ile TGF- β arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01

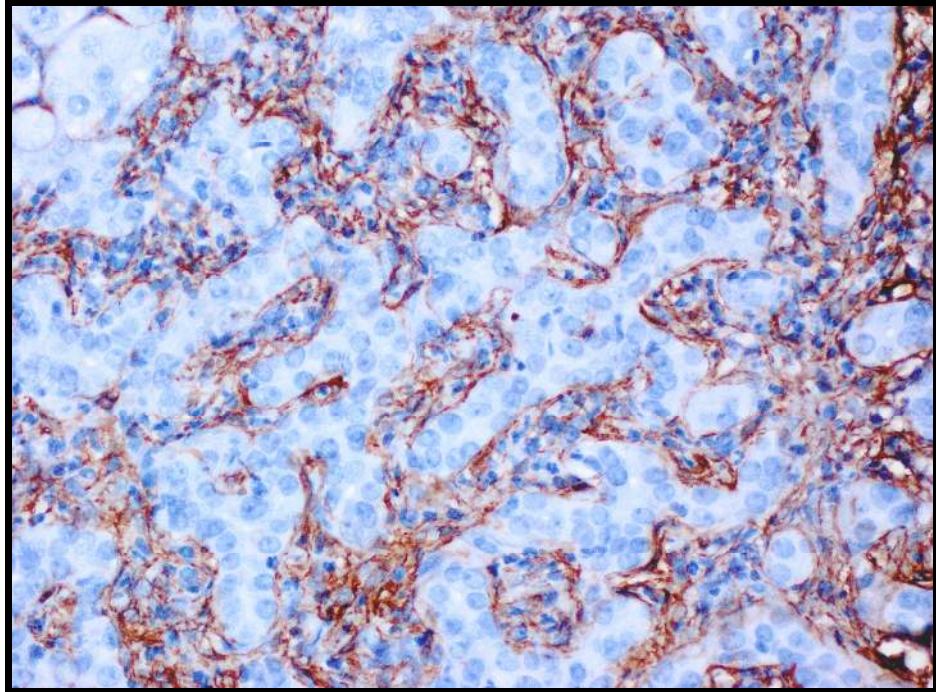
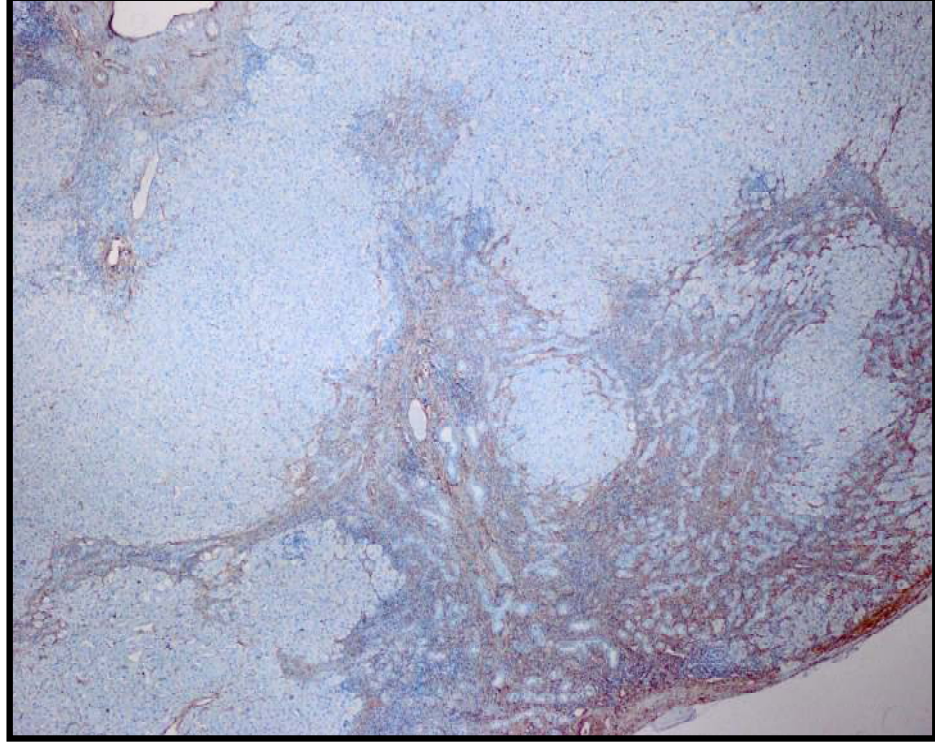
FSP-S100A4 ile E-kaderin+Kollagen Tip I dual boyanması arasında anlamlı kabul edilebilir düzeyde pozitif korelasyon saptandı	0.059
TGF- β ile E-kaderin+Kollagen Tip I dual boyanması arasında pozitif korelasyon saptandı	0.006
Fibrozis ile nekro-inflamatuar aktivite derecesi arasında pozitif korelasyon saptandı	0.01



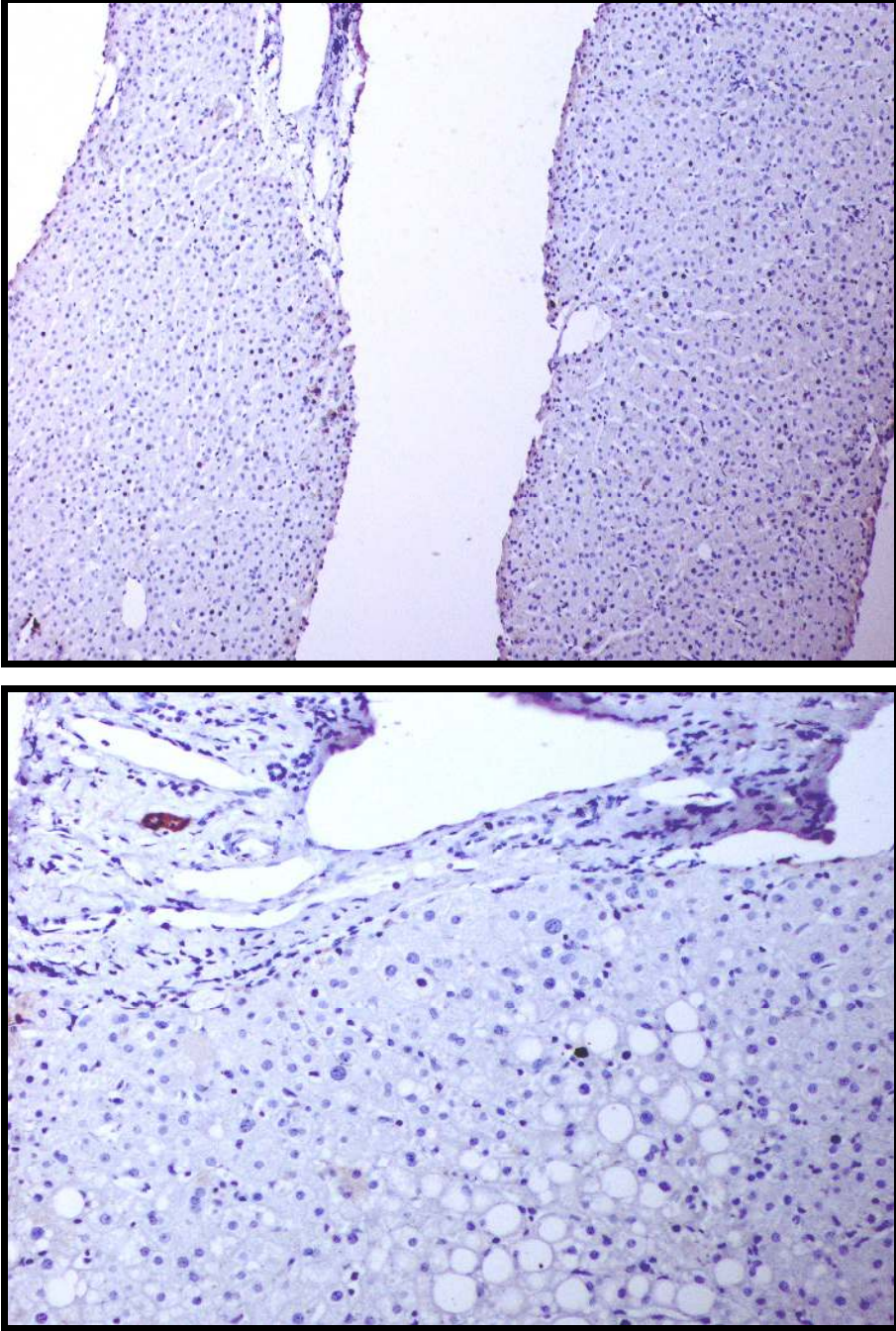
Resim 1-2. Kontrol grubunda portal alandaki damar düz kaslarında alfa-düz kas aktin pozitifliği izlenirken, parankimdeki hücrelerde herhangi bir boyanma görülmemektedir (x20 ve x40)



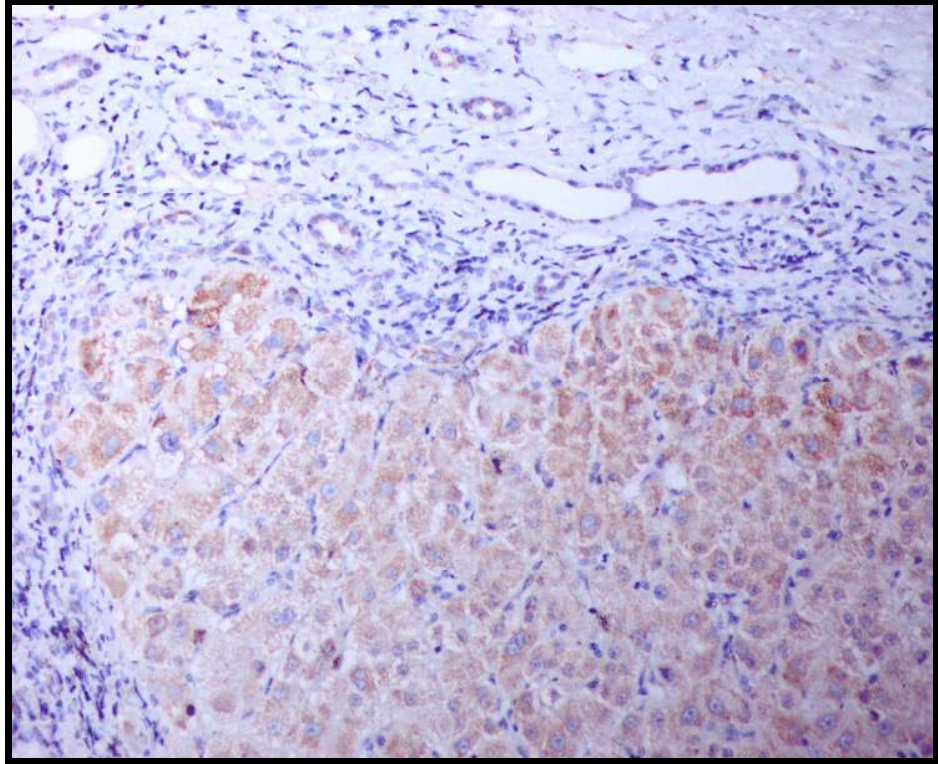
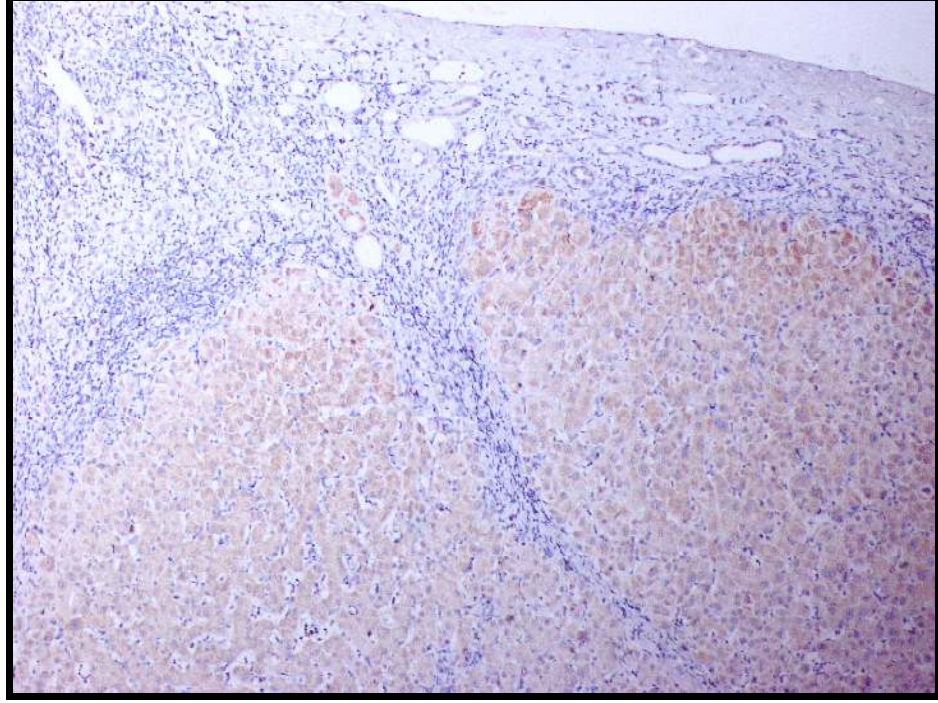
Resim 3-4. Fibrozis düzeyi minimal olan olguda parankim içinde alfa düz kas aktini 1+ olarak değerlendirilen aktive stellat hücreler (x20 ve x40)



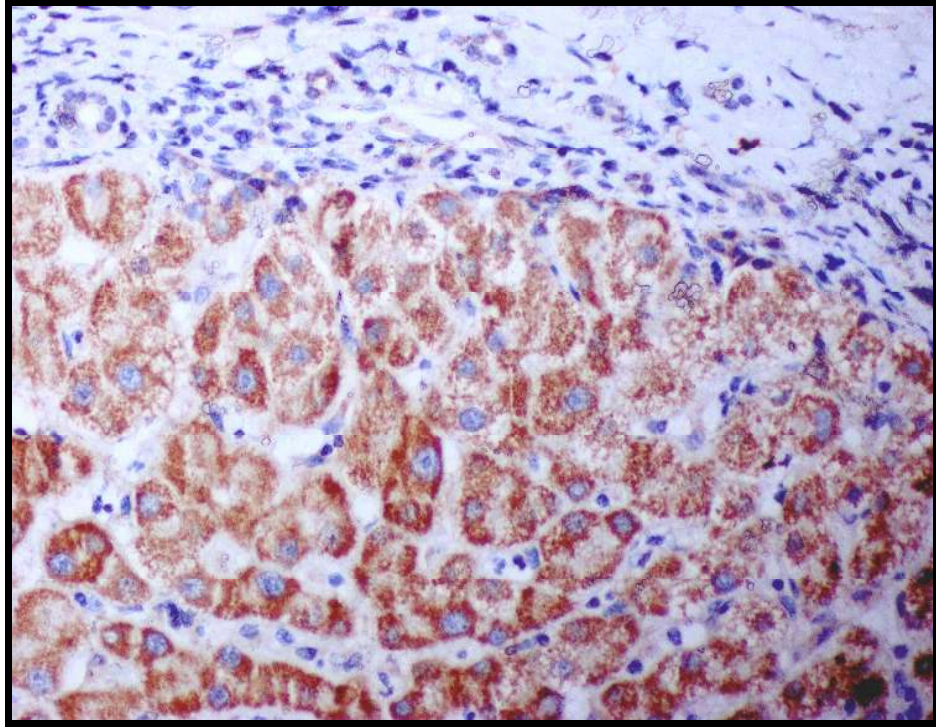
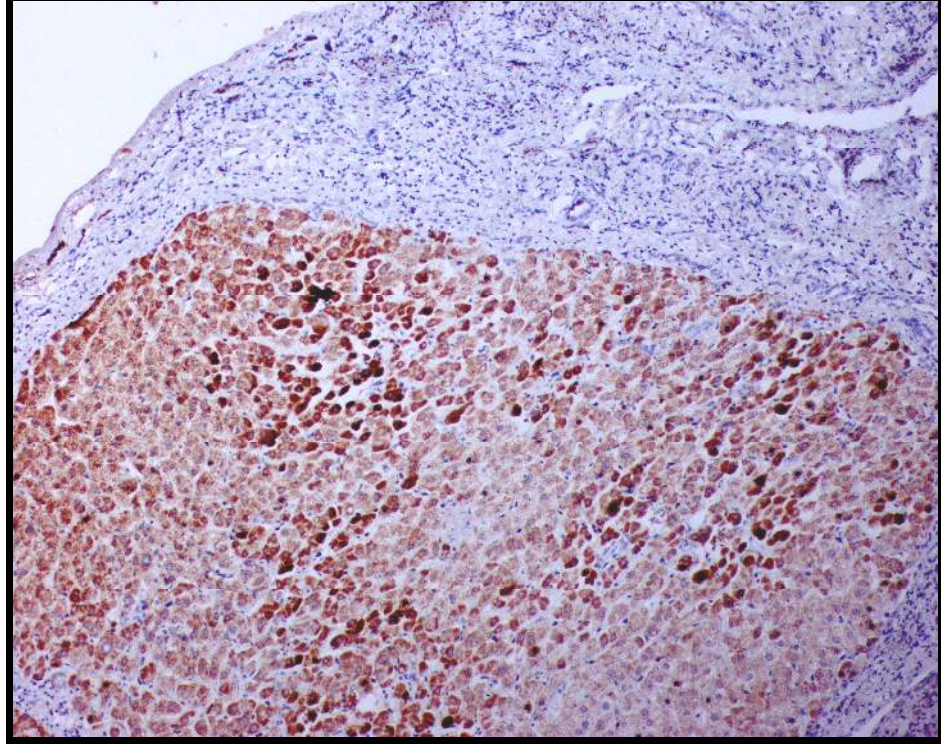
Resim 5-6. Kama biyopsisinde sirotik karaciğerde (fibrozis skoru 6) alfa düz kas aktini ile 3+ olarak değerlendirilen alanlar (x4 ve x40)



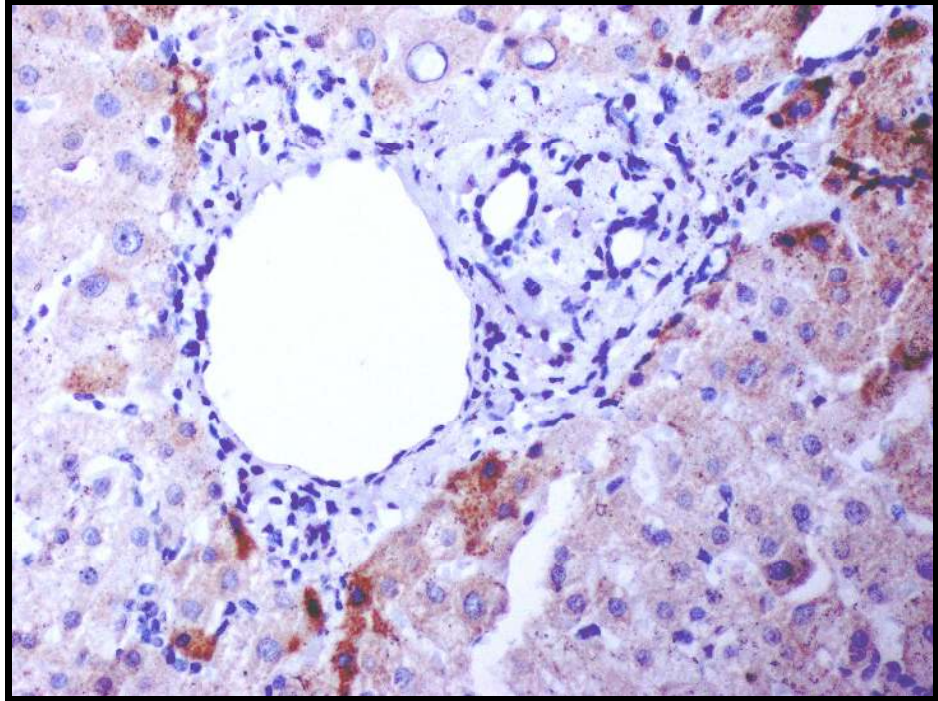
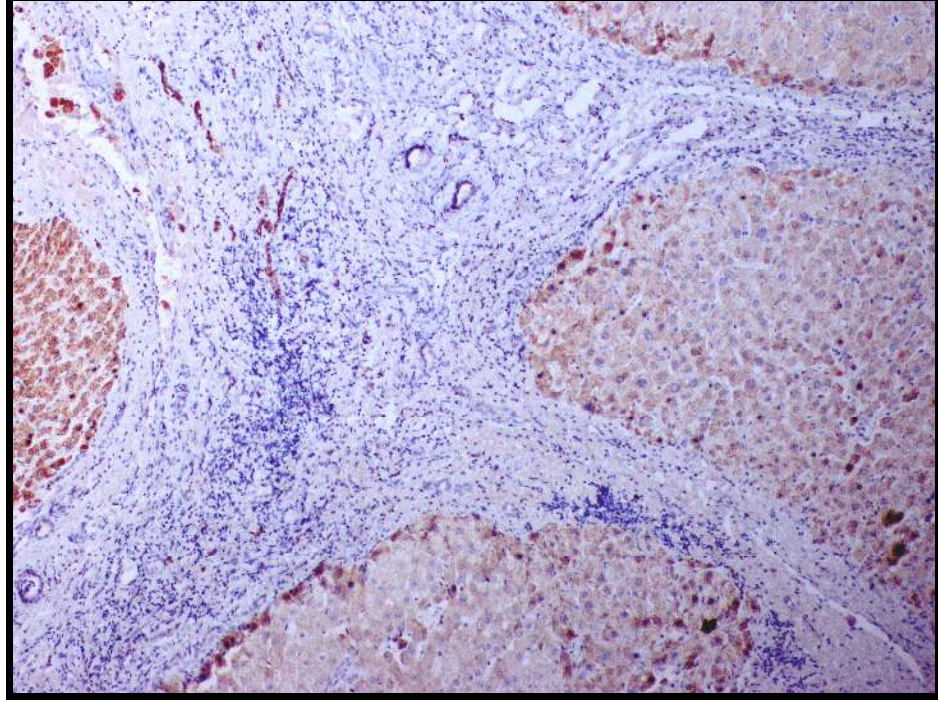
Resim 7-8. Kontrol grubundaki kalın iğne biyopsisinde TGF- β ile safra duktuslarında boyanma izlenirken parankimde herhangi bir boyanma görülmemektedir (x20 ve x40)



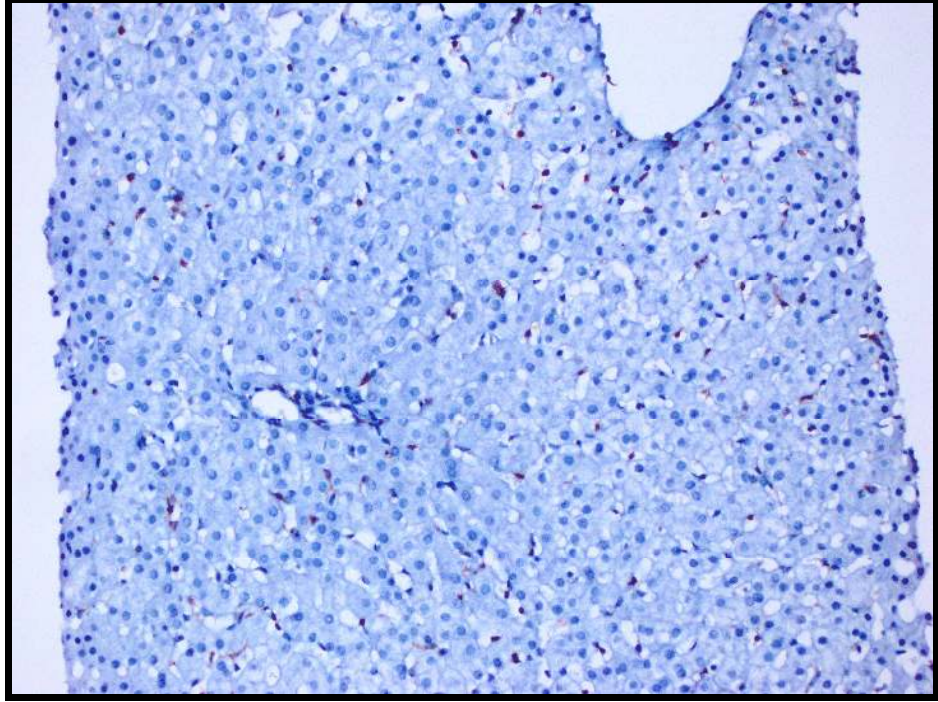
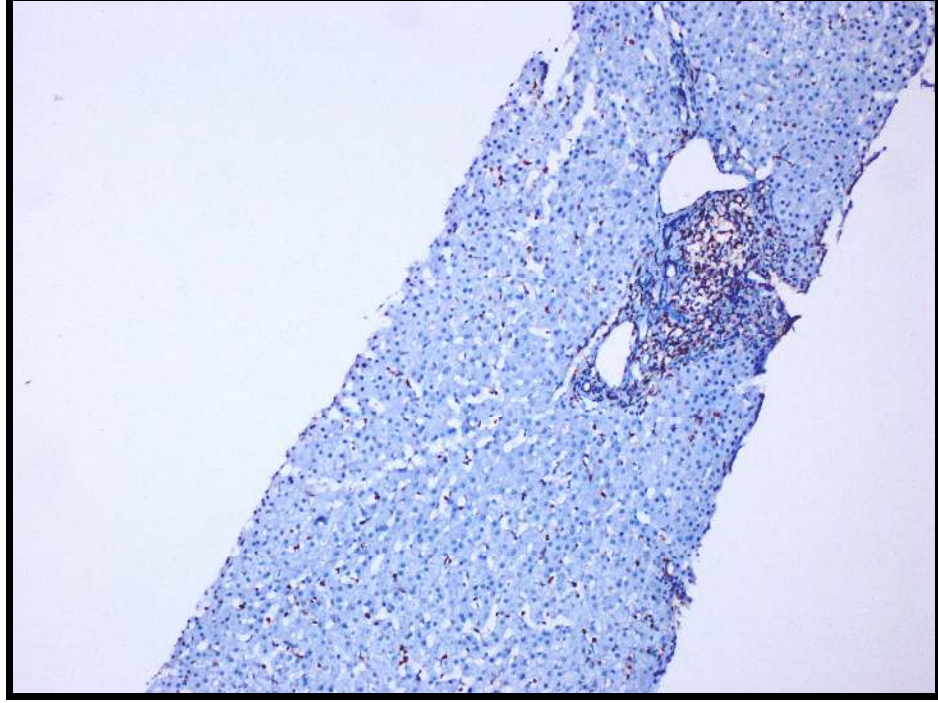
Resim 9-10. Kama biyopsisinde TGF- β ile 1+ olarak değerlendirilen alanlar (x20 ve x40)



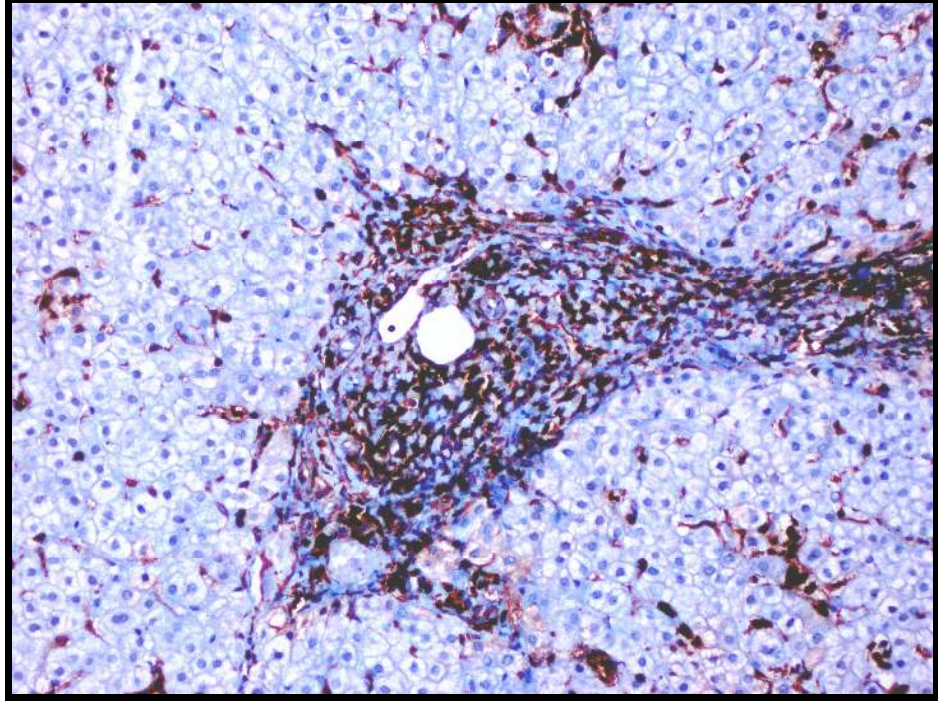
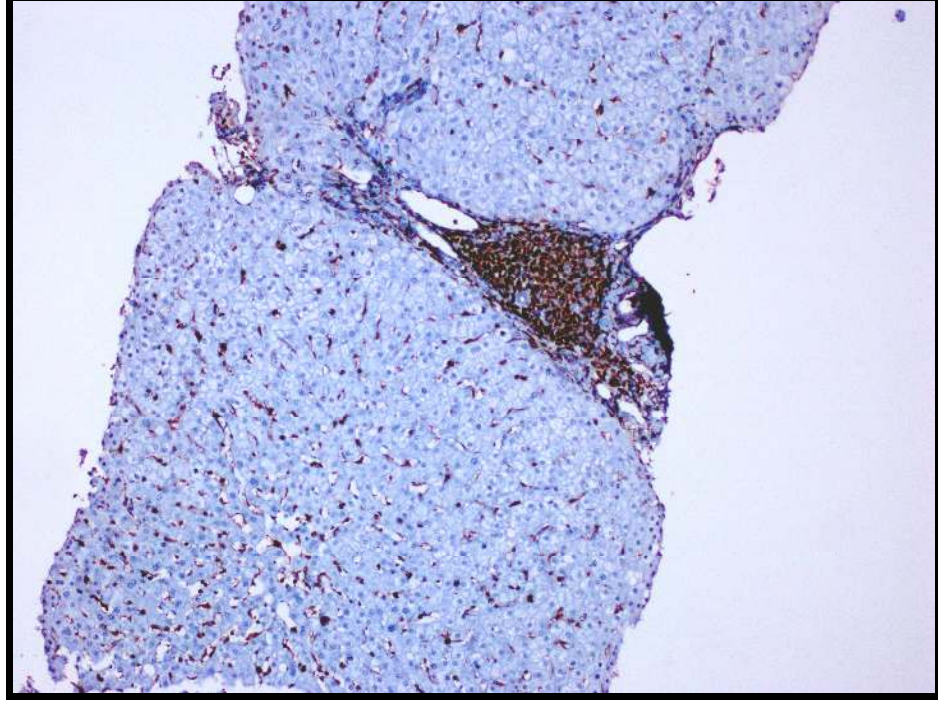
Resim 11-12. Kama biyopsisinde sirotik karaciğerde (fibrozis skoru 6) TGF- β ile 3+ olarak değerlendirilen alanlar (x20 ve x40)



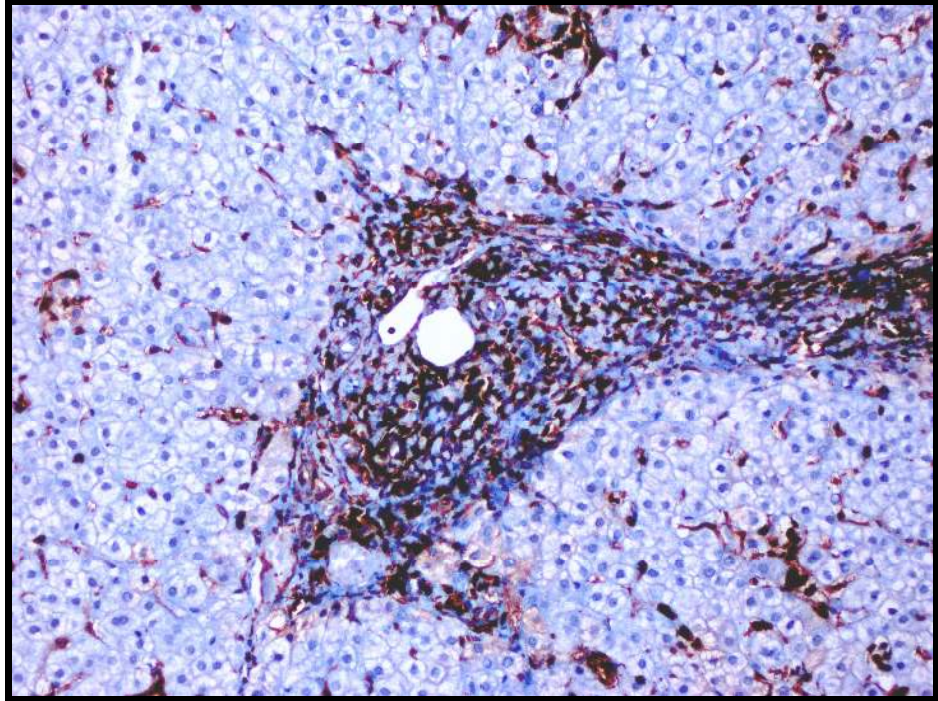
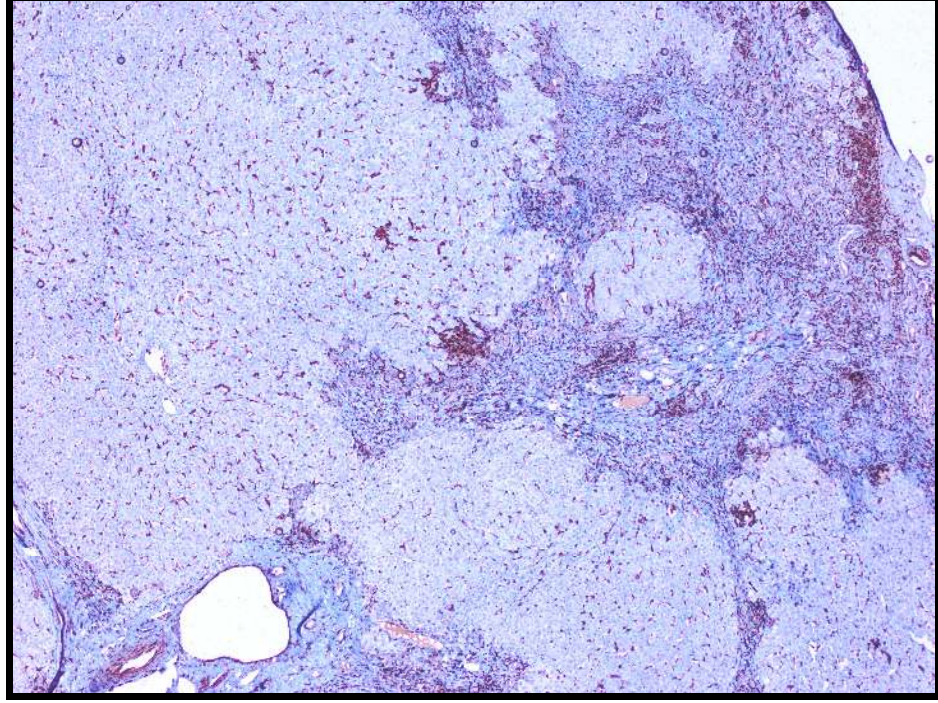
Resim 13-14. Kama biyopsisinde özellikle periportal alanlardaki hepatositlerde yoğunlaşan TGF- β boyanması (x20 ve x40)



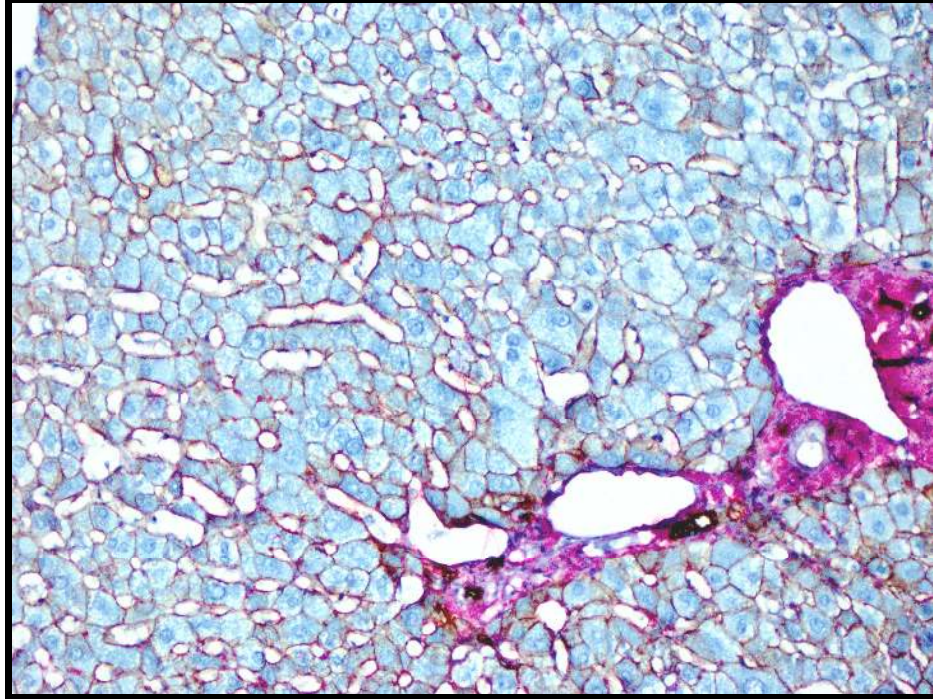
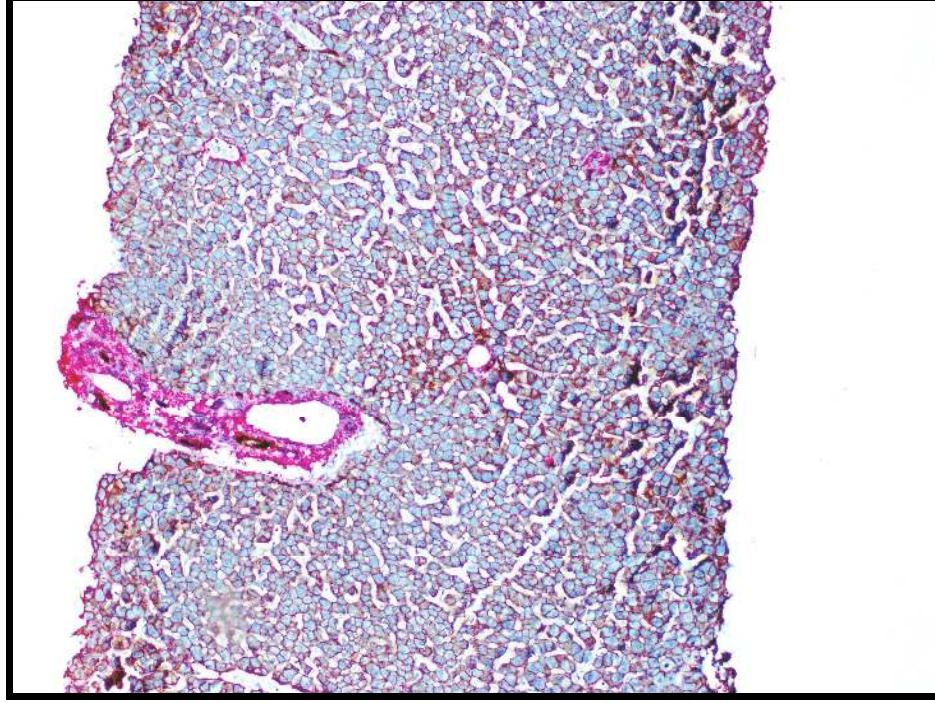
Resim 15-16. Kontrol grubunda iğne biyopsisinde parankimdeki Kupffer hücrelerinde ve portal alanlardaki lenfositlerde tek tük FSP-S100A4 boyanması (x20 ve x40)



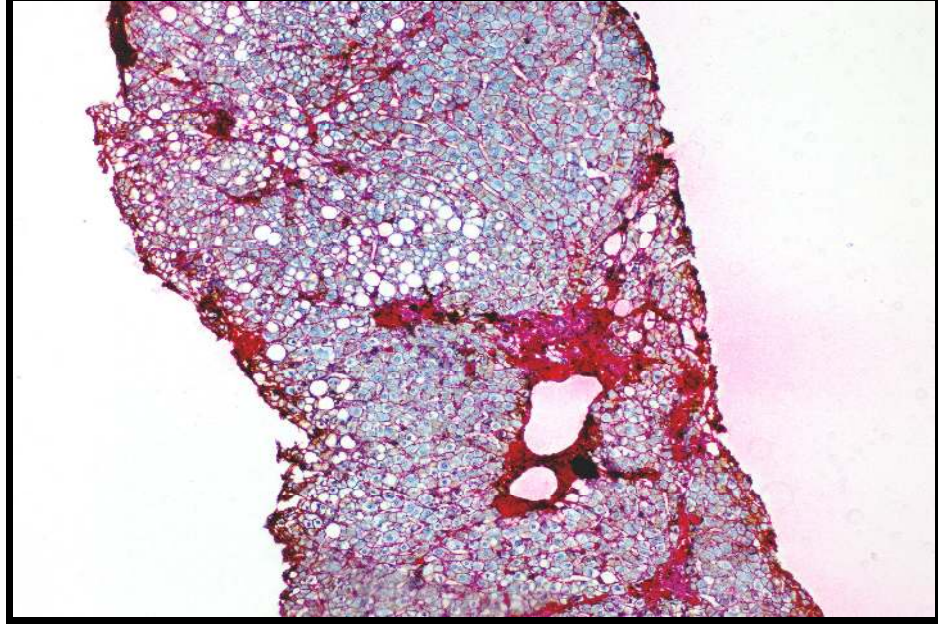
Resim 17-18. Kalın iğne biyopsisinde FSP-S100A4 ile fibroblastik aktivitenin 1+ olarak değerlendirildiği alanlar (x20 ve x40)



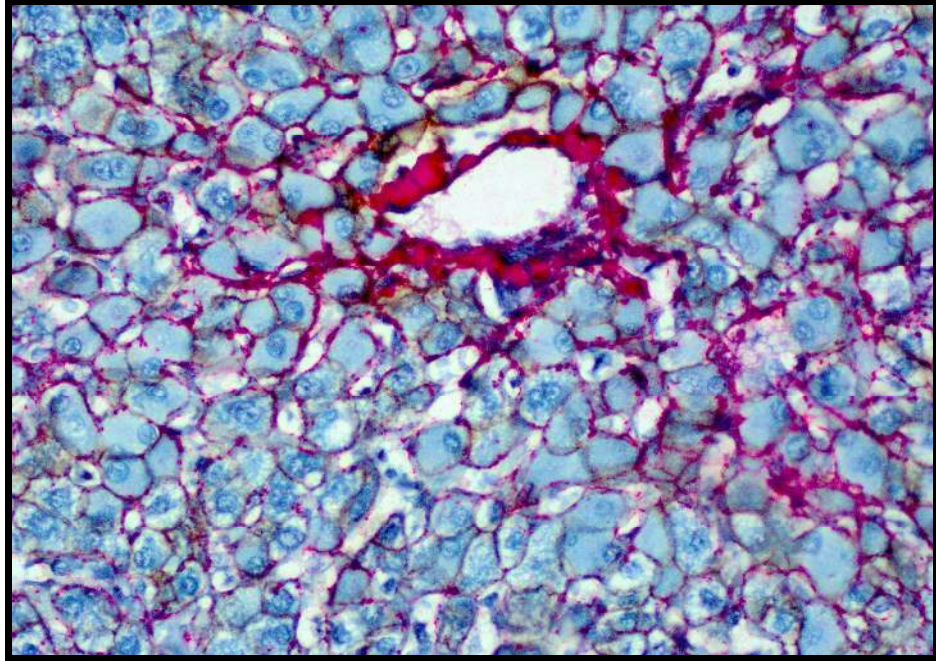
Resim 19-20. Kama biyopsisinde sirotik karaciğerde (fibrozis skoru 6) FSP-S100A4 ile 3+ olarak değerlendirilen alanlar (x20 ve x40)



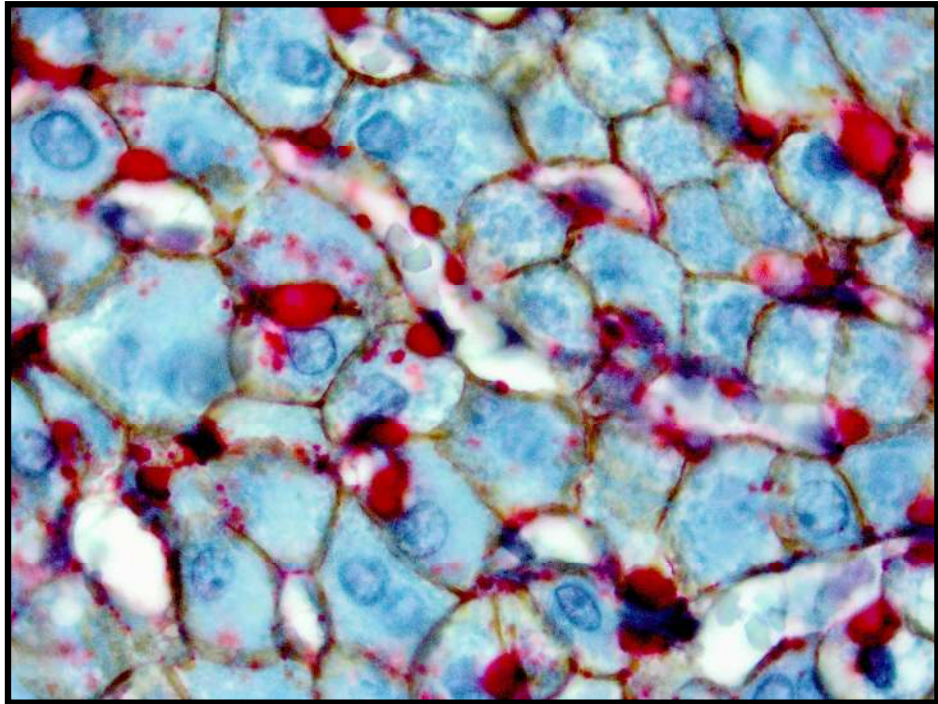
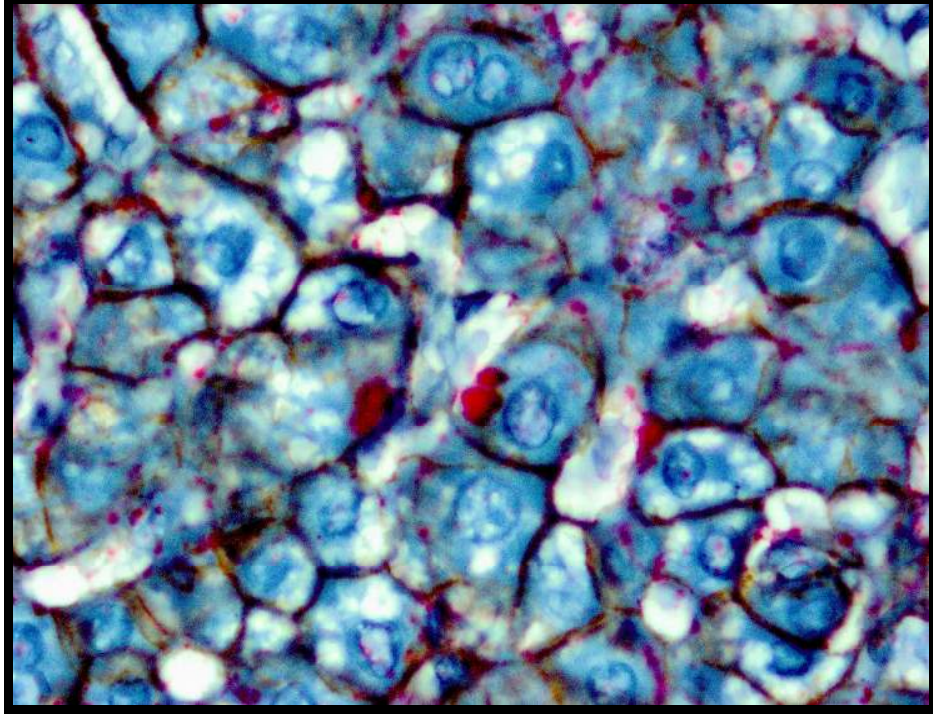
Resim 21-22. Kontrol grubunda kalın iğne biyopsisinde portal alanlarda olağan Kollagen Tip I boyanması izlenirken periportal alanlarda E-kaderin+Kollagen dual boyanması görülmemektedir (x20 ve x40)



Resim 23. Kalın iğne biyopsisinde şiddetli olarak değerlendirilen E-kaderin+Kollagen dual boyanması (x20)



Resim 24. Santral ven çevresindeki olağan kollagen ve hepatosit membranları üzerinde noktasal kollagen boyanması değerlendirmeye alınmamıştır (x100)



Resim 25-26. Kalın iğne biyopsisinde periportal alanlarda yoğunlaşan hafif ve şiddetli olarak değerlendirilen E-kaderin+Kollagen dual boyanması gösteren hepatositler (x100)

TARTIŞMA

Hepatik fibrozis, akut veya kronik karaciğer hasarı sonrası interstisyel alanlarda ekstrasellüler matriks birikimi anlamına gelmektedir. Etiyolojiden bağımsız olarak siroz veya son dönem fibrozis; skarların etrafını saran hepatosit nodüllerinin ve geniş fibrotik bantların oluşması ile mikrovasküler yapıda ortaya çıkan değişikliklere yani hepatik mimarinin tamamen bozulmasına bağlıdır. Bu değişiklikler karaciğer fonksiyonlarını bozmakta ve portal hipertansiyona neden olmaktadır. Kronik viral hepatitlere bağlı olgularda fibrozis gelişmesi, hepatik hasarın güçlü bir kanıtıdır. Karaciğer fibrozisi, ESM bileşenlerinin aşırı miktarlarda depolanması sonucunda oluşan dinamik bir süreçtir. Karaciğer fibrozis kaskadı birkaç basamakta gelişir; HSH'ler ve Kupffer hücrelerinin aktivasyonu, HSH'lerin göçü, proliferasyonu, ekstrasellüler matriks sentezi ve depolanması, skar dokusunun yeniden düzenlemesi, fibrozis kontraksiyonu ve sonunda da HSH'lerin apoptozisi. Bu süreçte HSH'lerin proliferasyonu ve farklılaşması hepatik fibrozisin gelişmesiyle orantılıdır. HSH'ler, bağ doku bileşenlerinin aşırı miktarda depolanmasında esas rol oynayan hücrelerdir. Aktive HSH'lerin alfa-düz kas aktini eksprese ettiği daha önceki bir çok çalışmada gösterilmiştir (94,95). Bu olayların oluşmasında ana fibrojenik sitokin olan TGF- β 'nın rolü olduğu düşünülmektedir. Öte yandan karaciğer hasarı geliştiğinde yanıt olarak tip I kollagen içeriği de artmaktadır. Stellat hücrelerinin yoğunluğu, aktivasyonu ve fibrozis arasındaki ilişki çeşitli karaciğer hastalıklarında araştırılmıştır:

N. Akpolat ve ark. kronik hepatit B'li ve sirozlu hastaların karaciğer biopsi örneklerinde alfa-düz kas aktini ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirmişler ve aktin düzeylerini fibrozis evresi ile karşılaştırmışlardır. Fibrozis evresi arttıkça alfa-düz kas aktini ekspresyonunun arttığını ve bu ekspresyonun özellikle periportal, perisentral ve perisinuzoidal alanlarda anlamlı derecede belirgin olduğunu görmüşlerdir.

Ayrıca henüz fibrozis gelişmemiş bir kaç olguda alfa-düz kas aktini ekspresyonu saptamışlar ve bunların da özellikle belirgin nekro-inflamatuvar aktiviteye sahip olgular olduğunu belirlemişlerdir. Bu yüzden çalışma sonucunda kronik hepatit B'li hastalarda sadece periportal fibrozisin gösterilmesinin, fibrozis evresini değerlendirmede yeterli olmayabileceğini, özellikle erken evrelerde alfa-düz kas aktini ekspresyonunun fibrozisi saptamada yardımcı olacağını yani fibrozis gelişiminin bir habercisi olabileceğini belirtmişlerdir (88).

Dooley ve ark. ise inflamasyon ile aktive olan ve çoğalan HSH'lere paralel olarak sadece alfa-düz kas aktininin değil, aynı zamanda kollagen tip I ve TGF- β ekspresyonunun da arttığını belirtmişlerdir. Bu deneysel çalışmada anti-TGF- β tedavisinin, karaciğerde fibrotik gelişmeyi durdurduğunu ve fibrogenezisi azalttığını göstermişlerdir (96).

Chia-Ming Chu ve ark., kronik hepatit B ve C'li hastalarda immunohistokimyasal olarak alfa-düz kas aktini ekspresyonunu değerlendirerek, HSH aktivasyonunu ve bunun nekro-inflamatuvar aktivite derecesi ve fibrozis evresi ile ilişkisini araştırmışlardır. Hem kronik HBV hem de kronik HCV'lilerde nekro-inflamatuvar aktivite derecesi ve fibrozis evresi ile korele olacak şekilde, HSH aktivasyonunu göstermişlerdir. Ayrıca aralarında nekro-inflamatuvar ve biyokimyasal değerler arasında fark saptanmamasına rağmen kronik HCV'li olgularda HSH aktivasyonunun kronik HBV'li olgulara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu saptamışlardır (89).

Tomanovic ve ark. kronik HCV'li hastalarda alfa-düz kas aktinini immunohistokimyasal yöntemle çalışarak aktive HSH yoğunluğunu incelemişler, sonuç olarak; aktive HSH yoğunluğu ile fibrozis arasında pozitif korelasyon izlerken nekro-inflamatuvar aktivite derecesi ile anlamlı bir ilişki saptamamışlardır. Ayrıca aktive HSH'lerin anlamlı olarak portal alan ve fibröz septalarda bulunduğunu göstermişlerdir (87).

Tüm bu çalışmalarda görüldüğü gibi karaciğer hasarında alfa-düz kas aktini ekspresyonu, HSH aktivasyonuna paralel bir artış göstermektedir. Bu

bulgulara dayanarak HSH aktivasyonunun güvenilir bir belirleyicisi olarak kabul edebileceğimiz alfa-düz kas aktin ekspresyonu bizim çalışmamızda da fibrozis evresi ile anlamlı bir korelasyon göstermektedir ($p<0,05$). Ayrıca sirotik olgularımızda diğer fibrozis evreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha fazla alfa-düz kas aktin ekspresyonu saptanmıştır. Bu bulgu bize, HSH'lerin fibrozis gelişimindeki rolünden öte, siroz aşamasında daha yoğun bir HSH aktivasyonunun gerçekleştiğini düşündürmektedir. Kontrol grubumuzdaki hiç bir olguda periportal zonda ve parankim içinde alfa-düz kas aktini boyanmasının olmayışı, karaciğerdeki hasarın ve bunun sonucu oluşan inflamasyonun HSH aktivasyonunu tetiklediğini desteklemektedir. Yine çalışmamızda nekro-inflamatuvar aktivite derecesi ve fibrozis ile alfa-düz kas aktini ekspresyonu arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Ancak çalışmamızda fibrozis evresi "0" olan ve aktin ekspresyonu gösteren bir olgu saptanmamıştır. Bu bulgu Akpolat ve ark. tarafından öne sürülen "aktinin erken fibrozis belirleyicisi olduğu" görüşü ile çelişmektedir. Viral seroloji ile ilişkisi açısından baktığımızda özellikle HCV pozitif hasta grubumuzda alfa-düz kas aktini ekspresyonunun HBV pozitif olgulara göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Literatürle örtüşen tüm bu bulgular, kronik hepatitlerde sadece fibrogenez gelişiminde değil daha hücre hasarının başladığı noktadan itibaren, HSH aktivasyonunun ana yönlendirici basamak olduğunu bize düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda HCV pozitif olgularda fibrozis evresi, alfa-düz kas aktini, TGF- β ekspresyonu ve E-kaderin+Kollagen dual ekspresyonu HBV'ye göre anlamlı derecede daha fazladır. Bu durum HCV'nin fibrozise ve bunun sonucu siroza gidişte HBV'den daha etkili olduğu fikrini doğurmuştur.

Literatürde yeralan alkolik karaciğer hastalığında fibrozis oluşumu ile ilgili bir çalışmada, 87 perisentral hasarlı ancak portal alanların normal olduğu alkolik steatohepatit olgusu ile 324 çeşitli evrelerdeki alkolik steatohepatit olgusu ve 10 kontrol olgusu incelenmiştir. Bu çalışmada erken evre olgularda stellat hücre aktivasyonunun perisentral bölgede olup, fibrozis ilerledikçe

daha diffüz hale geldiği görülmüştür. Kupffer hücre aktivasyonu CD68 ekspresyonu ile değerlendirilmiş ve tüm evrelerde, endotelial hücrelerde, periportal CD34 ekspresyonu izlenmiştir. Düz kas aktini ekspresyonu ile fibrosis evrelemesi karşılaştırılarak etanol hasarında fibrosis, aktive stellat hücreleri, Kupffer hücreleri ve endotelial hücrelerin etkisi ile meydana geldiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada, stellat hücre belirleyicisi olan düz kas aktini ile fibrosis perivenüler alandan başladığı daha sonra tüm karaciğere yayıldığı gözlenmiştir. Etanole bağlı fibrogenezisin stellat hücre ve Kupffer hücre aktivasyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (97).

Diyabetes Mellitus ve obezite konusunda yapılan başka bir çalışmada, karaciğer biopsilerine immunohistokimyasal olarak kollagen tip IV, alfa-düz kas aktini ve laminin uygulanmıştır. Bu çalışmada aktive stellat hücreler genelde zon 3'te ve perisinüzoidal bölgede izlenmiştir. Kollagen ve laminin Disse aralığında diffüz, perisentral alanda ve/veya sentral ven duvarında çeşitli yoğunluklarda izlenmiştir. Diyabetes Mellitus olmayan hastalarda sinüzoidal kollagen depozitleri ve alfa-düz kas aktini immunreaktivitesi steatozun derecesi ile ilişkili, Diyabetes Mellitus'lu hastalarda ise ilişkisiz bulunmuştur. Sonuçta, diyabetik olmayan grupta hepatik fibrosis stellat hücre aktivasyonu ile direk olarak ilişkili saptanmıştır (98). Bu son iki çalışmanın da gösterdiği gibi sadece viral hepatitlere bağlı fibrosis değil, etiyolojisi ne olursa olsun fibroze yol açan tüm hepatik hasarlarda, HSH aktivasyonu başrolü oynamaktadır.

Günümüzde karaciğer fibrosis engellenebilir ve siroz da geri dönebilir patolojik süreçler olarak kabul edilmekte ve çalışmalar fibrogenez basamaklarını anlamak ve bu süreci engellemek yönünde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalarda fibrogenezisin başlangıç noktası HSH aktivasyonu gibi gözükmemektedir. HSH aktivasyonuna yol açan temel uyaran olan TGF- β ile ilgili araştırmalar en çok umut bağlanan çalışmalardır. Anti-TGF- β tedavisi ile ilgili pek çok hayvan deneyi pozitif sonuç vermiş olmakla birlikte, insan denemelerine henüz geçilmemiştir. Günlük patoloji uygulamalarında kronik

hepatitlerde kullanılan aktivite ve fibrozis derecelendirmeleri ile; TGF- β 'nın fibrotik karaciğerdeki ekspresyonunu karşılaştıran çalışmalar, literatürde oldukça nadirdir. Oysa ki histolojik aktivite indeksi ve fibrozis derecesiyle, TGF- β ekspresyonları arasında kurulabilecek herhangi bir ilişki, hastalığın izlemi aşamasında, patoloji ve klinik uygulamalar açısından faydalı olacaktır. Literatürde insan dokularının kullanıldığı araştırmaların sayısı çok az olup, viral hepatitler ya da deneysel olarak oluşturulan toksik ve biliyer siroz tipleri kullanılmış, fakat metabolik ve otoimmün nedenli kronik karaciğer hastalıkları pek araştırılmamıştır.

TGF- β 'nın karaciğerde yalnızca hasar halinde eksprese edildiği, normal karaciğerde eksprese olmadığı bildirilmektedir (55, 59). Buna paralel olarak bizim çalışmamızdaki kontrol grubunda da hepatositlerde TGF- β ekspresyonu saptanmamıştır. Bu bulgu karaciğerde primer bir hasar olmadan TGF- β ekspresyonu olmadığı düşüncesini desteklemektedir. Kronik hepatit olgularımızda TGF- β ekspresyonu fibrozis skoru ile uyumlu olarak artmaktadır. TGF- β ekspresyonu ile hem nekro-inflamatuvar aktivite hem de fibrozis evresi arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon saptanmıştır ($p < 0,05$). Morfolojik olarak ayrıntılı incelendiğinde bu ekspresyonun periportal bölgedeki hepatositlerde yoğunlaştığı görülmektedir. Ayrıca hepatit ve siroz olguları TGF- β ekspresyonu açısından kıyaslandığında, siroz grubunda TGF- β ekspresyonunun belirgin şekilde yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Yine çalışmamızda HCV pozitif hastalarda TGF- β ekspresyonunun HBV'ye göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu bulgu HCV'nin, inflamasyonu ve bunun sonucu oluşan fibrozisi daha fazla uyardığı fikrini doğrulamaktadır. TGF- β hepatositler dışında safra duktusları tarafından da eksprese edilir, ancak farklı fibrozis skoruna sahip olgularımızda safra duktusları ile TGF- β ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir.

Çalışmamızda yaş ve cinsiyet ile TGF- β ekspresyonunun yaygınlığı ve yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bedossa ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada çocuk hastalardaki TGF- β

ekspresyonu erişkinlere oranla daha az bulunmuş olup, bu bulgu dokulardaki matürasyonla ilişkilendirilmiştir (53). Bizim çalışmamızda ise çocuk hastalarda (18 yaş ve altı) TGF- β ekspresyonunun yoğunluğu erişkinlerle benzer oranda bulunmuştur. Ancak çocuk olgularımız 4 tane ile sınırlı olup bu sayı herhangi bir yorumda bulunmak için yetersizdir.

Biliyer atrezili olgularda yapılmış bir çalışmada, immunohistokimyasal olarak alfa-düz kas aktini yanı sıra prokollagen $\alpha 1$ mRNA ve TGF- β mRNA için in-situ hibridizasyon uygulanmıştır. TGF- β ekspresyonunda Kupffer hücrelerinin rolü immunohistokimyasal olarak CD68 uygulanarak gösterilmiştir. Bu çalışmada biliyer atrezili hastalarda artan kollagen yapımından ve artan TGF- β düzeylerinden aktive stellat hücrelerinin sorumlu olduğu ve bu hücrelerin fibrozis sürecinde önemli katkısı olduğu vurgulanmıştır (100). Spee ve ark.'nın köpek ve insan dokularında yaptığı bir çalışmada ise tersine bir bulgu olarak inflamasyonun şiddetinin TGF- β -1 reseptör mRNA düzeylerini değiştirmedeği bildirilmektedir (101). Görüldüğü gibi insan dokularında TGF- β ekspresyon düzeyleri ile ilgili çalışmalar yetersiz olmakla kalmayıp aynı zamanda çelişkili sonuçlar vermektedir. Bizim bulgularımız hücre hasarı ve fibrozis ile TGF- β ekspresyonunun arttığı yönündedir.

Shi ve ark. yaptıkları çalışmada, ileri evre siroz olgularında TGF- β ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bunun da fibrojenenezisin aktif veya tamamlanmış olmasına bağlı bir bulgu olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu bulgularla siroz gelişiminin tamamlandığı olgularda matür kollagen ile Disse aralığının tamamen kapandığını, TGF- β ile boyanmada azalma (down-regülasyon) olduğunu ve fibrojenenezin durduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu duruma yol açan nedenin sinuzoidal boşluğun tamamen kapanmasıyla parankimde gelişen hipoksi ve hipoksinin yol açtığı TGF- β ekspresyonundaki değişiklik olduğunu belirtmişlerdir (99).

Paik ve ark. yaptıkları bir çalışmada displastik nodül ve hepatosellüler karsinomda TGF- β -1 ve TGF- β -1 reseptör ekspresyonlarını incelemişler ve

displaziden karsinoma geçiş aşamalarında TGF- β -1 reseptör ekspresyonunun çok değişmediğini; ancak karsinoma komşu hepatositlerde belirgin olarak artış olduğunu görmüşlerdir. Sonuç olarak sirozun ileri aşamasına kadar TGF- β -1 ekspresyonunun arttığını ancak belli bir aşamadan sonra azaldığını, tümör gelişiminde ise tamamen kaybolduğunu göstermişlerdir (102). Son iki çalışmada görüldüğü gibi TGF- β , yalnızca fibrojenik bir sitokin olmakla kalmayıp aynı zamanda karsinogeneze sürecinde TGF- β ekspresyonunda inhibisyon söz konusudur. Ancak fibrozis ve fibrozis zemininde gelişen karsinomlar ile TGF- β 'nın bu şaşırtıcı ilişkisini açıklığa kavuşturmak için daha geniş kapsamlı çalışmalar gereklidir.

Çalışmamızda en fazla değerlendirme sorunu yaşadığımız antikör olan FSP-S100A4, lenfositlerde, makrofajlarda, periportal alandaki fibroblastlarda ve parankim içinde Kupffer hücrelerinde yoğun olarak boyanma göstermiştir. Bu nonspesifik boyanma, başlangıçta myofibroblastik aktivitenin belirleyicisi olduğune sürülen FSP-S100A4'n gerçekte makrofaj/fibroblast kökenli hücreler için bir belirleyici olduğunu bize göstermiştir. Buna rağmen FSP-S100A4'n değerlendirilmesindeki sorun, hücrelerin lokalizasyon ve şekline bakılarak aşılmıştır. Her ne kadar bu sorun objektif değerlendirmeyi azaltsa da FSP-S100A4'n boyanma şiddeti ile fibrozis düzeyi ve histolojik aktivite indeksi arasında pozitif korelasyon izlenmiştir ($p < 0,05$). Ancak viral hepatit tipi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. Kontrol grubunda 5 olguda görülen hafif düzeydeki FSP-S100A4 ekspresyonu “normale yakın da olsa bu olgularda herhangi bir hasara bağlı hafif düzeyde fibroblastik aktivasyon bulunabilir” şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamızda, boyanan hücre popülasyonunun genişliği ve değerlendirmedeki sorunlar nedeniyle FSP-S100A4'n myofibroblastik aktiviteden çok nekro-inflamatuar aktivitenin bir belirleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır.

sterreicher ve ark'nın insan karaciğer dokusunda ve stellat hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde FSP-

S100A4 'ün myofibroblastik hücreler ya da myofibroblast öncüsü hücreler için spesifik bir belirleyici olmadığını saptanmıştır (91).

Karaciğerde fibrozise yol açan hücreler, öncelikle aktive olmuş HSH'ler ve myofibroblastik aktivitesi olduğu düşünülen fibroblastlardır. Bu konuyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda bu iki hücre dışında fibrozise yol açan başka mekanizmaların da olduğu gündeme gelmiştir. "Epitelial mezenkimal geçiş" olarak bilinen ve sadece fibrogenesisde değil embriyogenez, tümör invazyonu ve metastazında da rol oynayan bu mekanizmada epitelial özellikteki bir hücre zamanla mezenkimal özellik kazanmaktadır. Karaciğerde EMT'a uğradığı düşünülen bu hücreler hepatositler ya da kolanjiyositlerdir. Bizim çalışmamızda dual immunohistokimyasal boyama yöntemiyle membranöz boyanan E-kaderin ile sitoplazmik boyanan Kollagen Tip I'i birlikte eksprese eden hepatositler araştırılmıştır. Dual boyanma gösteren hepatositler periportal ve periseptal bölgede yoğunlaşmaktadır ve bu hepatositler boyanma yoğunluklarına göre hafif ya da şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda fibrozis ve histolojik aktivite ile dual boyanmayı sergileyen hücrelerin yoğunlukları arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol olgularında kriterlerimize uygun olarak dual boyanan (EMT'a dönüşmekte olan) hepatosit görülmemiştir. Bu durum ancak hepatik hasar halinde bu dönüşümün gerçekleştiği fikrini desteklemektedir. Ancak bu hücrelerin hiçbirisinde epitelial belirleyici olan E-kaderin kaybı görülmemiştir. Oysa teorik açıdan bakıldığında, EMT oluşum basamaklarında önce hepatositin adezyon moleküllerini kaybetmesi, epitelial bağlantılarından kurtularak hepatosit kordonu dışına atılması ve daha sonra mezenkimal özelliklerin gelişmesi beklenmektedir. Olayların gelişim sırasındaki bu sapmanın bize göre iki olası açıklaması yapılabilir. İlki hepatositler hücre kordonu dışına atılmadan önce kollagen ekspresyonunun başlama olasılığıdır. Hücre içi olaylar ve artan sitokin uyarıları, hepatositlerde gen transkripsiyonundaki değişiklikleri henüz epitelial özelliklerin kaybolmadığı aşamada başlatıyor olabilir. Bizim mikroskopik gözlemlerimizde

kollagen globüllerini hepatosit sitoplazması içinde az sayıda ve küçük olarak görmemiz, bu düşüncüyü desteklemektedir. İkinci olasılık ise her ne kadar immunohistokimyasal boyama yöntemleri standardize edilmiş olsa da moleküler ekspresyonları değerlendirmek için daha sofistike yaklaşımların ve moleküler çalışmaların gerekliliğidir.

Kimori ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada fare hepatosit hücre kültüründe TGF- β ile uyarılmış kollagen tip I sentezleyen ve epiteliyal bir belirteç olan E-kaderin ile albumini aynı anda eksprese eden hepatositler immunfloresan yöntemle araştırılmıştır (77). Her ne kadar bu çalışmada mezenkimal bir belirleyici olarak albumin kullanılsa da bunun ekstrasellüler bir matriks proteini olduğu düşünüldüğünde bizim çalışmamızla benzer özellikler taşımaktadır. Ayrıca immunfloresan boyama immunohistokimyasal boyamaya oranla daha hassas bir yöntemdir ve sonuçta bu çalışma ile de EMT gösteren hepatositlerin varlığı gösterilmiştir.

Li ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada fare kök hücre kültüründe epiteliyal bir belirteç olan sitokeratin-7 ile albumini aynı anda eksprese eden hücreler immunfloresan yöntemlerle gösterilmiştir (76). Bu çalışmada her iki belirleyicinin hücrelerin sitoplazmasında eksprese ediliyor olması bir dezavantaj gibi görülse de immunfloresan yöntem kullanılması daha hassas ve spesifiktir.

Deng ve ark. da biliyer atreziye bağlı fibrozis gelişmiş olgularda immunohistokimyasal yöntemlerle sitokeratin-7, S100-A4 ve alfa düz kas aktini uygulayarak, Sitokeratin-7 ile S100A4'ü aynı anda eksprese eden hepatositleri hem immunfloresan hem immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir (78). Yine bu çalışmada da sitokeratin-7 ve FSP-S100A4 immunohistokimyasal olarak sitoplazmik bir boyanma sergilemektedir. Bu durum değerlendirme yapılırken sorun yaratabilir. Ayrıca yapılmış olan başka çalışmalarda ve bizim bulgularımızda FSP-S100A fibroblastlara spesifik olmayıp makrofaj, lenfosit ve plazma hücreler tarafından da eksprese edildiğinden spesifik bir boyanma olarak kabul edilmemelidir.

Rygiel ve ark. intrahepatik biliyer epiteliyal hücre kültürlerinde immunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemi ile sitokeratin-7, sitokeratin-19, alfa-düz kas aktini ve FSP-S100A4 çalışmışlardır. Primer biliyer siroz, Primer sklerozan kolanjit ve alkolik karaciğer hastalığına sahip olgulardan yapılan hücre kültürlerinde duktuler reaksiyon gösteren biliyer epiteliyal hücrelerinde sitokeratin-7 ve FSP-S100A4'ü birlikte eksprese eden epiteliyal-mezenkimal dönüşüme uğradığı düşünülen hücreler gösterilmiştir (75). Kolanjiyositlerde öne sürülen EMT için bizim yaptığımız değerlendirmede ise dual boyanma gösteren kolanjiyositler araştırılmış, ancak her iki immunohistokimyasal belirleyiciyi birlikte eksprese eden kolanjiyosit saptanmamıştır.

Çalışmamızda bütün bu bilgilerin ve son yıllardaki araştırmalara ait bulguların ışığı altında patogeneizde adı en çok geçen ve en önemli noktalarda görev yapan TGF- β -1, alfa düz kas aktini, FSP-S100A4, Kollagen Tip I ve E-kaderin molekülünün kronik hepatitli, sirozlu ve olağan karaciğer dokularında ekspresyonları incelenmiştir. Fibrozisin farklı aşamalarını sergileyen karaciğer dokularında bu moleküllerin ekspresyonunda bir değişiklik var mı?, varsa bu bizi hasta takibinde ve tedavisinde yönlendirebilir mi? sorularına cevap aranmıştır. Ulaşabildiğimiz kadarıyla literatürde bu moleküller ayrı ayrı olarak çalışılmış ancak hepsinin birbiriyle ilişkisini gösteren insan dokularında yapılmış bir araştırma mevcut değildir.

Anti-fibrojenik tedavi hedefleri açısından bakıldığında, TGF- β inhibitörleri uygun hedefler olsa da, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, bu tip bir tedavinin hepatit ve sirozlu olgularda etkili olacağını, inaktif sirozdaki etkisinin kısıtlı olacağını öne sürebiliriz. Ancak bu hipotezin kesinleşebilmesi için çok daha geniş serilere ve TGF- β 'nın tüm alt tiplerinin çalışıldığı daha ayrıntılı ve çok merkezli araştırmalara gerek vardır. Vasküler sisteme yönelik tedavi ajanlarının kullanıldığı (TGF- β -reseptör analogları, TGF- β antagonistleri, anjiotensin reseptör antagonistleri v.b.) çalışmalardan hayvan deneyi bazında da olsa umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Ancak

TGF- β 'nın şu ana dek gösterilmiş bipolar etkileri nedeniyle, henüz faz çalışmaları süren TGF β antagonistlerinin uzun süreli kullanımı halinde, etkilerinin tersine dönüp hepatokarsinogenezi ve otoimmün hastalıkları tetiklemesinden çekinilmektedir.

Bir patolog olarak karaciğer biopsileriyle klinisyene sağladığımız bilgi 'fibrozis var mı?, varsa ne aşamada?, tümör gelişmiş mi?' sorularını yanıtlamak ve hastanın takibini kolaylaştırmaktır. Hastalarda gelişen fibrozisin takibini kolaylaştıracak non-invaziv bir belirleyici arayışı devam etmektedir. şu ana kadar bu amaçla hedef alınan belirleyicilerin (konnektif doku büyüme faktörü-CTGF gibi) hiçbirisi istenilen sonucu vermemiştir. Çünkü hastalığın derecesi ve evresi ile bu belirleyicilerin serumdaki düzeyleri uyumlu değildir (66). Bu nedenle iğne biopsileri tanı ve takipte hala altın standarttır. Ancak fibrozisin dinamik sürecini morfoloji ile kesin olarak belirlemek mümkün olmayabilir. Bu durum araştırmacıları dokuda standart bir belirleyici saptama yoluna itmiştir. Pek çok aday molekül araştırılmaktadır. Bu nedenle var olan hastalığın sonucundan ziyade nedenini ve nasıl geliştiğini anlamaya yönelik çalışmalar başı çekmektedir. Patogenezin araştırıldığı çalışmalarda sıklıkla hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar insandan elde edilen hücre kültürleri kullansa da, çoğunlukla yapılmış çalışmalarda hayvanlardan elde edilen hücre kültürleri kullanılmıştır ve kullanılmaktadır. Ancak bu araştırmacıların özellikle vurguladığı bir nokta; hayvanlara ait dokular ile insanlara ait olanlar arasında belirgin fark olduğudur. Örneğin insan hücre kültürlerinde TGF- β transkriptleri saptanırken; sıçan hücre kültürlerinde TGF- β transkriptlerinin saptanamadığı çalışmalar vardır. Yapılan araştırmaların sonuçları bu nedenle çok farklı ve tartışmaya açıktır. Bu da insan dokularında yapılan çalışmaları daha anlamlı kılmaktadır.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Aktive HSH'ler alfa düz kas aktini eksprese etmektedir.
- Kontrol grubunda alfa düz kas aktini ile yalnızca damar düz kaslarında boyanma saptanmıştır.
- Bizim çalışmamızda fibrozis evresi ile alfa-düz kas aktini ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur($p<0,05$).
- Ayrıca sirotik olgularda diğer fibrozis grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha fazla alfa-düz kas aktini ekspresyonu saptanmıştır. Bu da HSH'lerin siroz oluşumunda çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir.
- Kontrol grubundaki hiç bir olguda alfa-düz kas aktini boyanmasının olmayışı, karaciğerde hasar ve bunun sonucu oluşan inflamasyon olmadan HSH aktivasyonun olmayacağı görüşünü desteklemektedir.
- Çalışmamızda HAI derecesi ve fibrozis düzeyi ile alfa-düz kas aktini ekspresyonu arasında pozitif korelasyon görüldü ($p<0,05$). Özellikle HCV pozitif hasta grubunda alfa-düz kas aktini ekspresyonunun HBV pozitiflere göre daha fazla olduğunu saptanmıştır.
- Kontrol grubunda TGF- β ile boyanma saptanmamıştır.
- Çalışma grubunda TGF- β ile boyanma saptanan hücre tipleri; safra duktusları ve portal alana komşu hepatositler olup TGF- β ekspresyonunun yoğunluğu ile fibrozis arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).
- TGF- β ile en kuvvetli boyanma fibrozis evresi 5 ve 6 (yani sirozlu) olan hastalar olup TGF- β ekspresyonunun yaygınlığı ve yoğunluğu ile yaş, cinsiyet arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ayrıca etiyolojik nedenin HCV olduğu grupta HBV'ye göre TGF- β ekspresyonu daha fazla bulunmuştur.
- TGF- β ekspresyonunun yaygınlığı ve yoğunluğu ile HAI ve fibrozis düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p<0,05$).
- TGF- β ile en kuvvetli boyanma periportal bölgedeki hepatositlerde görüldü. Lobül içi boyanma daha hafifti. Boyanan bir başka hücre tipi ise safra

duktusları olup bu ekspresyonla fibrozis düzeyi arasında anlamlı ilişkili bulunmamıştır.

- 18 yaş ve altı vakalarda TGF- β ekspresyonu erişkinlerle aynı orandaydı. Literatürde çocuk hastalarda bu ekspresyon daha az olarak bulunmuş ve bu durum olgunun matürasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür.
- Elde edilen sonuçlar toplu olarak yorumlandığında; TGF- β ekspresyon ve yoğunluğu fibrozis derecesiyle birlikte giderek artmış, Sirozu olan dokularda diffüz ve yaygın olarak bulunmuştur.
- FSP-S100A4 fibroblastlar, lenfosit ve plazma hücreleri ve Kupffer hücreleri tarafından eksprese edilir. Fibroblastlar özellikle portal alanlar çevresinde yer alır. Olgularımızda artan fibrozis evresiyle birlikte portal alanlar çevresinde yoğunlaşan FSP-S100A4 ekspresyonu göstermektedir ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).
- E-kaderin+Kollagen dual boyanmasını sergileyen hepatositlerin çoğunluğu periportal ve periseptal bölgelerde yer almaktadır ve bu boyanma artan fibrozis düzeyi ile birlikte yoğunlaşmaktadır.

ÖZET

AMAÇ: Karaciğerde herhangi bir toksik ya da iltihabi hasara karşı gelişen fibroziste en fazla rol oynayan anahtar hücre HSH'lerdir. Bu süreçte fibrojenik bir sitokin olan TGF- β 'nın fonksiyonu, HSH'ler aracılığı ile Kollagen tip I salgılatarak ESM'in yeniden yapılanmasını sağlamaktır. Son yıllarda fibrozis konusunda yapılan çalışmalarda sadece HSH'lerin değil EMT gösteren hücrelerin de ekstrasellüler matriks proteinlerini salgıladığı düşünülmektedir. Çalışmamızda aktive HSH'lerin ve tüm bunlara yol açan TGF- β 'nın değişen fibrozis evreleriyle ilişkisini ve epiteliyal mezenkimal dönüşüm gösteren hücrelerin varlığını göstermek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bölümümüzde karaciğer biopsi materyallerinde kronik viral hepatit tanısı almış farklı fibrozis skorlarına sahip 70 olgu ve 20 adet kontrol olgusu seçilerek tümüne immunohistokimyasal belirleyicilerden TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -Düz kas aktini, Kollagen Tip I ve E-kaderin uygulanmıştır.

BULGULAR ve SONUÇLAR: Artan fibrozis derecesi ve inflamasyonla TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -Düz kas aktini ve E-kaderin+Kollagen Tip I ekspresyonları artmıştır. Bu bulgu fibrogenesis sürecinde bu moleküllerin rol oynadığını düşündürmektedir. Özellikle HCV'ye bağlı kronik hepatit olgularında HBV'ye göre TGF- β 1, α -Düz kas aktini ve E-kaderin+Kollagen Tip I ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. FSP1/S100A4 fibroblastlar dışında diğer yangı hücrelerini de boyadığından spesifik olmadığı sonucuna varılmıştır. Dual immunohistokimyasal boyama yöntemiyle karaciğerde EMT gösterdiği düşünülen hepatositler saptanmıştır.

ABSTRACT

Histopathologic and immunohistochemical process parameters (TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -smooth muscle actin, collagen type 1 and E-cadherin) fibrogenesis in chronic liver disease with the evaluation

AIM: The HSH cells plays important role in liver developed fibrosis with any toxic or inflammatory damage In this process, a fibrogenic cytokine, function of TGF- β ensure that the restructuring the ECM by secreted collagen type I. In recent years, studies on fibrosis suggests not only HSH cells also EMT cells secreted the extracellular matrix proteins. In our study, we aimed demonstrate that of the HSH's and all this leads to TGF- β relationship between changing fibrosis phases and showed epithelial mesenchymal transformation cells.

MATERIALS AND METHODS: In this study, we taken for evaluate 70 patients with a diagnosis of chronic viral hepatitis whom liver biopsy materials with different fibrosis scores and 20 control subjects. We performed, all of the immunohistochemical markers of TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -smooth muscle actin, collagen type I, and E-cadherin on materials.

RESULTS, CONCLUSIONS: Increased fibrosis and inflammation, TGF- β 1, FSP1/S100A4, α -smooth muscle actin and E-cadherin + Collagen type I increased. This finding suggests a role of these molecules in the process of fibrogenesis. We found positive correlation between expression of α -smooth muscle actin, TGF- β 1 and E-cadherin + Collagen type I in HBV chronic hepatitis cases compared to HCV chronic hepatitis. FSP1/S100A4 painted the other inflammatory cells except fibroblasts also thought the it is not specific. Dual immunohistochemical staining hepatocytes in the liver was performed EMT.

KAYNAKLAR

1. MacSween RNM, Desmet VJ, Roskams T, Scothorne RJ. Developmental and normal structure. In MacSween RNM, Burt AD, Portman BC, Ihsak KG, Scheuer PJ, Anthony PP, editors. Pathology of the liver. 4th ed. London : Churchill Livingstone.; 2002. p. 1-61.
2. Scheuer PJ.ed Liver biopsy interpretation.4th edition. London, Bailliere Tindall, Ch;1-39.
3. Suriwiawinata AA, Thung SN. Liver. InMills S. Histology for Pathologists. 3rd edition.Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins.Ch28; 685-701.
4. Lee RG.ed. Diagnostic Liver Pathology. 1st Edition, St Louis, Mosby. Ch;1: 1-20.
5. Burt A,Portmann B, Ferrell L, Mac Sween's Pathology of the liver. 6th ed. Churchill Livingston- Elsevier :2012;361-402.
6. Karagöz İ, Haktanır A. Kronik karaciğer hastalıkları. Tıp Araştırması Dergisi 2004;(2):33-40.
7. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of Chronic Hepatitis: Diagnosis , grading and staging . Hepatology 1994; 19: 1513-1520.
8. Gorham JD. Transforming growth factor beta-1, Th1 responses and autoimmune liver disease. Transfusion 2005; 45: 51-58.
9. Kobayashi S, Seki S, Kawada N, Morikawa H, Nakatani K, Uyama N et al. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells. Cell Tissue Res 2003; 311: 353-364.
10. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. Hepatology 2004; 39(2): 273-278.

11. Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenguer C, Enrich C et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38: 919-929.
12. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews - Cancer* 2006; 6:674-687.
13. Goodman ZD, Terracciano LM. MacSween's Pathology of the liver Churchill Livingstone- Elsevier. 5th ed. 2007, Chapter 15, pp 761-788.
14. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48(1):76-169.
15. Gerber MA, Thung SN. The diagnostic value of immunohistochemical demonstration of hepatitis viral antigens in liver. *Human Pathology* 1987; 18:771-774.
16. Ferrel LD, Theise ND, Scheuer PJ. Acute and chronic viral hepatitis. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishaq KG, Scheuer PJ, Anthony PP. *Pathology of the liver*. 4th ed. London: Churchill Livingstone, 2002;313-362.
17. Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF, et al. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan. Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985;5:431-434.
18. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241.
19. Hsu HC, Su IJ, Lai MY, et al. Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1987; 5:45-50.
20. Naumov NV, Portman BC, Tedder RS, et al. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990;99:1248-1253.

21. Chu CM, Liaw YF. Membrane staining for hepatitis B surface antigen in hepatocytes: a sensitive and spesific marker of active viral replication in hepatitis B. *J Clin Pathol* 1995;48:470-473.
- 22.Hsu HC, Lai MY, Su IJ, et al. Correlation of hepatocyte HbsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology* 1988;8:749-754.
- 23.Lorito MA, Marcellin P, Bismuth E, et al. Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and liver after spontanueus or therapeutically induced HBeAg to AntiHBe or HBsAg to AntiHBs seronversation in patients w,th chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992.;15:227-233.
- 24.Liaw YF, Yang SS, Chen TJ, et al. Acute exacerbation in HBe antigen positive chronic type B hepatitis a clinicopathological study. *Journal Hepathology* 1985;1:227-233.
- 25.Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *Journal Hepathology* 2002;36:543-546.
- 26.Wang WL, London WT, Lega L, et al. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1991;14:29-37.
- 27.Gowans EJ, Burrell CJ, Jilbert AJ, et al. Cytoplasmic hepatitis B virus core antigen reflects HBV-DNA syntesis at the level of the infected hepatocyte. *Intervirolgy* 1985;24:220-225.
- 28.Naoumov NV, Daniels HM, Davidson F, et al. Identification of hepatitis B virus DNA in the liver byin situ hybridization esing a biotinylated probe. Relation to HBcAg expression and histology. *Journal Hepathology* 1993;19:204-210.

29. Bianchi L, Gudas F. Chronic hepatitis. In MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Portmann B, Burt A, eds. Pathology of the liver, 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994;349-395.
30. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. 1995;15: 70-81.
31. Dhillon AP, Dusheiko GM. Pathology of hepatitis C virus infection . Histopathology 1995; 26:297-309.
32. Verme G, Amoroso P, Lettieri G, et al. A histologic study of hepatitis delta virus liver disease. Hepatology 1986;6:1303-1307.
33. Bean P. Latest discoveries on the infection and coinfection with hepatitis D virus. Am J Clin Lab;2002;21:25-27.
34. Ishak KG, Baptista A, Bianchi L, et al. Histologic grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol 1995;22:696-699.
35. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981;1:431-435.
36. Ferrel LD, Theise ND, Scheuer PJ. Acute and chronic viral hepatitis. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP. Pathology of the liver. 4th ed. London: Churchill Livingstone, 2002;313-362.
37. Westin J, Lagging LM, Wejstal R, et al. Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. Liver 1999; 19: 183-187.
38. Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. Am J Clin Pathol 2000;113:40-55.
39. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? Hepatology 2006; 43(2): 82-88.

40. Sonsuz A. Karaciğer Sirozunun Etiyolojisi ve Patogenezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hepatobilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları. İstanbul. 2002; 28: 87-91.
41. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. Journal of Hepatology 2003; 38:38-53.
42. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. J Cell Mol Med 2006; 10(1): 76-99.
43. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 2004; 1:98-105.
44. Crawford JM. Pathologic basis of disease. Elsevier Inc. 7th ed. 2005, Liver and biliary tract, pp 877- 927.
45. Lara-Pezzi E, Gomez-Gavero MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membranetype matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. J Clin Invest 2002; 110: 1831-1838.
46. Bissell MD. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. Exp Mol Med 2001; 33(4): 179-190.
47. Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: Mechanims of ironinduced hepatic fibrogenesis. Seminars in Liver Disease. 2005; 25 (4):433-449.
48. Snover DC. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Lippincott Williams& Wilkins. 4th ed. 2004, Nonneoplastic liver disease, pp1677-1692.
49. Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver Fibrosis. J Clin Gastroenterol 2005; 39(2): 158-161.

- 50.Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939.
- 51.Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver International* 2006; 26:8-22
- 52.Ebstein RJ. *Human Molecular Biology*. Cambridge University Press. 1st ed. 2003, Hormones and growth factors, pp 333-336.
- 53.Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor beta1 and TGF β -1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995; 21: 760-766.
- 54.Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Path* 2004; 85: 47-64.
- 55.Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic marker? *Med Sci Monit* 2002; 8(7): 145-151.
- 56.Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF β strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(11): 121-131.
- 57.Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM. Id1 is a critical mediator in TGF- β -induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006; 43: 1032-1041.
- 58.Wells RG. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 845-850.
- 59.Mikula M, Proel V, Fischer ANM, Mikulits W. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF- β dependent fashion. *J Cell Physiol* 2006; 209 (2): 560-567.
- 60.Albanis E, Friedman L. Antifibrotic agents for liver disease. *American J Transplantation* 2006; 6: 12-19.
- 61.Schuppan D, Krebs A, Bauer M, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10: 59-67.

62. Bataller R, Brenner DA. Genetic polymorphisms and fibrosis: A critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493-503.
63. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. TGF β signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochimica Polonica* 2005; 52 (2): 329-337.
64. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic basis of disease. Elsevier Inc. 7th ed. 2005, Neoplasia, pp269-343.
65. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 Apr;25(2):207-17.
66. Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009 Sep 25;2(1):4.
67. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1438-49.
68. Pinzani M Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? *J Hepatol.* 2011 Aug;55(2):459-65.
69. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition *Hum Pathol.* 2009 Oct;40(10):1365-76.
70. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1417-9.
71. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009 Jun;119(6):1420-1428.
72. Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *J Biochem Cell Biol.* 2009 Nov;41(11):2089-93.

- 73.Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1776-84.
- 74.Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):830-9.
- 75.Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest.* 2008 Feb;88(2):112-23.
- 76.Li B, Zheng YW, Sano Y, Taniguchi H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation *PLoS One.* 2011 Feb 11;6(2):170-92
- 77.Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem.* 2007 Jul 27;282(30):22089-101.
- 78.Deng YH, Pu CL, Li YC, Zhu J, Xiang C, Zhang MM, Guo CB. Analysis of biliary epithelial-mesenchymal transition in portal tract fibrogenesis in biliary atresia. *Dig Dis Sci.* 2011 Mar;56(3):731-40.
- 79.Lei W, Zhang K, Pan X, Hu Y, Wang D, Yuan X, Shu G, Song J. Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Sep;42(9):1489-97.
- 80.Maheswaran T, Rushbrook SM.. Epithelial-mesenchymal transition and the liver: role in hepatocellular carcinoma and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Mar;27(3):418-20.
- 81.Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it

- start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jul;23(7 Pt 1):1024-35.
- 82.Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006 Mar 27;172(7):973-81. 69.
 - 83.Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):2007-13.
 - 84.Kallis Y N, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut* 2007;56:716-724.
 - 85.Kisseleva T, Brenner DA. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Apr 15;5(3):338-42.
 - 86.Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*. 2004 Dec 1;64(23):8492-5.
 - 87.Tomanovic NR, Boricic IV, Brasanac DC, Stojic ZM, Delic DS, Brmbolic BJ. Activated liver stellate cells in chronic viral C hepatitis: histopathological and immunohistochemical study. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009; 18(2): 163-167
 - 88.Akpolat N, Yahsi S, Gokekmerdan A, Yalniz M, Demirbag K. The value of alpha-SMA in the evalution of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis devoplement: a histopathological and immunohistochemical study. *Histopathology* 2005;47(3): 276-280.
 - 89.Chu CM, Shyu WC, Liaw YF. Comperative studies on expression of alpha-smooth muscle actin in hepatic stellate cells in chronic hepatitis B and C. *Dig Dis Sci*. 2008; 53(5):1364-1369.

90. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996;21:134-140.
91. Österreicher CH, Penz-Österreicher M, Grivennikov SI, Guma M, Koltsova EK, Datz C, Sasik R, Hardiman G, Karin M, Brenner DA. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 4;108(1):308-13.
92. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptor as a morphogenic regulator. *Science* 1991; 251:1451-1455.
93. Kanenori E, Tsuyhi U, Junichi U, et al. Immunoreactivity E-cadherin, α -catenin, β -catenin proteins in hepatocellular carcinoma: Relationships with tumor grade clinicopathologic parameters and patients survival. *Uman pathology* 2000;31:558-565.
94. Kweon Y, Goodman ZD, Diestang JL, Schiff ER, Brown NA, Burkhardt E. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2001; 35: 749-755.
95. Guido M, Rugge M, Chemello L et al. Liver stellate cells in chronic viral hepatitis: the effect of interferon therapy. *J Hepatol*. 1996; 24: 301-307.
96. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, et al. Transforming growth factor β signal transduction in hepatic stellate cells via Smad 2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during invitro progression to myofibroblast. *FEBS Letter* 2001; 502: 4-10.
97. Chedid A, Arain S, Snyder A, Mathurin P, Capron F, Naveau S. The Immunology of Fibrogenesis in Alcoholic Liver Disease. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2004, Vol. 128:11; 1230-1238.

98. Jaskiewicz K, Rzepko R, Sledzinski Z. Fibrogenesis in Fatty Liver Associated with Obesity and Diabetes Mellitus Tip2 , Dig. Dis. Sci. 2008; 53; 785-788.
99. Shi YF, Fong CC, Zhang Q, Cheung PY, Tzang CH, Wu RSS et al. Hypoxia induces activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF β signaling pathway. FEBS Letters 2007; 581: 203-2107.
100. Ramm G.A, Nair V.G, Bridle K.R, Shepherd R.V, Crawford D.H.G; Contribution of Hepatic Parenchymal and Nonparenchymal Cells to Hepatic Fibrogenesis in Biliary Atresia; American Journal of Pathology, Vol 153, No.2, August 1998; 527-535.
101. Spee B, Arends B, Ingh TSGAM, Brinkhof B, Nederbragt H, Ijzer J et al. Transforming growth factor β -1 signalling in canine hepatic diseases: new models for human fibrotic liver pathologies. Liver International 2006; 26: 716-725.
102. Paik SY, Park YN, Kim H, Park C. Expression of transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- β receptors in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. Mod Pathol 2003;16(1): 86-96.