



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER FİBROZİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİNDE NON-İNVAZİV  
YÖNTEMLERİN ÖNEMİ**

**DR. SALİH SERTAÇ DURUSOY  
UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL, 2015**



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER FİBROZİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİNDE NON-İNVAZİV  
YÖNTEMLERİN ÖNEMİ**

**DR. SALİH SERTAÇ DURUSOY  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN: PROF. DR. OSMAN CAVİT ÖZDOĞAN**

**İSTANBUL, 2015**

## ÖNSÖZ

Öncelikle tezimin hazırlanışında bana yol gösteren, desteğini, sabrını, bilgisini esirgemeyen, tecrübesini benimle paylaşan danışmanım değerli hocam Prof.Dr. Osman Cavit Özdoğan'a en samimi teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bizlere yol gösteren, bilgisini esirgemeyen, bizlere çok şey öğreten İç Hastalıkları Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. İshak Çetin Özener'e, istatistik ölçümlerinde yardımcı olan Prof. Dr. Nural Bekiroğlu'na, tezimin hazırlanışında ve laboratuvar çalışmalarında her konuda yardımcı olan Dr. Filiz Türe Özdemir'e, geçmiş hasta dataları ve bilimsel kaynak toplamamda yardımcı olan Uzm. Dr. Ender Güneş Yeğin'e teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan zevk aldığım, sayesinde kendimi daha mutlu ve güvende hissettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Dr. Yücel Aydın'a, birlikte hem yorucu zamanları hem de keyifli zamanları paylaştığımız ve çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan hekim arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan ve bugünlere getiren değerli anne ve babama, bu çalışmanın hazırlık süresince bana sunduğu kesintisiz manevi destek için eşim Dr. Gönül Karataş Durusoy ve oğlum Yağız Durusoy'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Salih Sertaç Durusoy

## ÖZET

**Giriş:** Kronik karaciğer hastalığında (KKH) tanısal seyir ve tedaviye cevap için en önemli gösterge fibrozisin ve yapısal değişimlerin derecesinin belirlenmesidir. Tanıda biyopsi hala altın standart olarak olmakla birlikte; kullanımında sınırlamalar bulunmaktadır. ELF test yeni non-invaziv bir tanı yöntemi olup, birincil amacımız popülasyonumuzda ELF test'in doğruluğunun araştırılması, diğeri ise DİA tip1 ve tip3 kollajen doku ile serum düzeylerinin korelasyonunu araştırmak ve bunların gelecekte fibrozis belirteci olarak önemini değerlendirmektir.

**Yöntem:** Çalışmaya karaciğer fibrozisi olan 54 hasta ile 37 sağlıklı gönüllü dahil edildi. DİA tip1ve tip3 kollajen sonuçları önceki çalışmadan elde edildi. Her iki gruptan, onam formları alınıp, kan numuneleri toplandı. Serumdan ELISA yöntemiyle ELF test ve tip1 kollajen sonuçları elde edildi. Bütün demografik, klinik ve laboratuvar parametreleri SPSS 20.00 kullanılarak değerlendirildi.

**Bulgular:** ELF testin sağlıklı ve hastayı ayırmada doğruluğu çok iyi (AUROC: 0,910, duyarlılık: %84, özgüllük: %89), ELF testin bir bileşeni olan HA'nında (AUROC: 0.908, duyarlılık %75, özgüllük %94,4) tek başına Elf test kadar güçlü olduğu gösterildi. ELF testin, anlamlı fibrozisi saptamada (İshak  $\geq$ F2, Knodell  $\geq$ F1) kesim değeri 8,41 için (AUROC: 0,90, duyarlılık %87, özgüllük %82 ) çok iyi, ileri derecede fibrozisi saptamada (İshak  $\geq$ F4, Knodell  $\geq$ F3) kesim değeri 9,47 için (AUROC: 0,79-0,81, duyarlılık %75-65, özgüllük %75-84 ) iyi olduğu görüldü. DİA tip1- tip3 kollajen OA'ları ile tip1 kollajen;( rs:0.489 p:0.001), tip3 kollajen; ( rs:0.441 p:0.001) anlamlı farkla orta dereceli korale bulundu.

**Sonuç:** ELF test fibrozis tanısında oldukça başarılıdır. Özellikle anlamlı ve ileri fibrozis evrelerinde doğruluğu (AUROC: 0,914, duyarlılık %100, özgüllük %77 ) daha da artmakla birlikte, popülasyonumuzda cut-off değerleri tekrar değerlendirilmelidir. Serum tip1-tip3 kollajen değerleri DİA ile orta düzeyde korelasyon göstermekle birlikte tek başlarına fibrozis tanısında kullanılmamalıdır.

**Anahtar sözcükler;** KKH, Fibrozis, ELF test, DİA, Tip1 kollajen, Tip3 kollajen

## ABSTRACT

**Background:** In Chronic Liver disease (CLD), in order to achieve the diagnosis and treatment, the most important factor is to determine the fibrosis and clarify the degree of structural change in the liver. Although the diagnosis of liver biopsy is still considered the gold standard, have limitations. ELF test is new non-invasive test, first aim is to evaluate the accuracy of the ELF test for our population, other is to evaluate if the DIA type1-type3 collagen tissue levels are correlated with the serum level, in order to understand the importance of them for the usefulness of future biomarker.

**Methods:** Fifty four liver fibrosis patients and 37 healthy volunteers were enrolled. DIA type1 and type3 collagen results obtained from previous study. Patients were recalled, after taking informed consent, blood samples were collected for the analysis of ELF test and serum type1 collagen levels by ELISA. All of the demographic, clinic, and laboratory parameters were recorded to the SPSS 20.0 and analyzed to determine the accuracy of each test.

**Results:** The accuracy of the ELF test in distinguishing healthy and liver fibrosis is good enough (AUROC: 0.910, sensitivity 84%, specificity: 89%), HA which is a component of the ELF test (AUROC: 0.908, sensitivity 75%, specificity 94.4%) found to be as strong as ELF test. For detection of significant fibrosis (Ishak  $\geq$ F2, Knodell  $\geq$ F1) cut off value of 8.41 (AUROC: 0.90, sensitivity 87%, specificity 82%), for detection of severe fibrosis (Ishak  $\geq$ F4; Knodell  $\geq$ F3) cut-off value of 9.47 (AUROC: 0.79-0.81, sensitivity 75-65%, specificity 75-84%) were found to be appropriate for our population. As for the correlation of DIA type1-type3 collagen values were moderately correlated with the serum type1-type3 collagen respectively: (rs: 0.489-0.441 p = 0.001).

**Conclusions:** ELF test is a good method in the diagnosis of fibrosis. Especially in diagnosis of significant and/or severe fibrosis (AUROC: 0.914, 100% sensitivity, 77% specificity). However, cut off levels for the significant and/or severe fibrosis should be redetermined for our population. Serum collagen type1-type3 tests have moderate correlation for DIA levels and should not be used for the fibrosis biomarker solely.

**Keywords;** CLD, Fibrosis, Elf test, DIA, Type 1 collagen, Type 3 collagen

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
KISALTMALAR .....	v
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ .....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ:.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Skrolama Sistemleri .....	3
2.2 Morfometrik Yaklaşım .....	5
2.3 Fibrozisin Non-invaziv Değerlendirilmesi .....	6
2.3.1 Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test .....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	9
3.1. Etik Kurul ve BAPKO.....	9
3.2 Çalışma Popülasyonu .....	9
3.2.1 Çalışmaya dahil edilme - dışlanma kriterleri.....	10
3.2.2 KC biyopsi ve DİA sonuçlarının toplanması.....	10
3.3 ELF Test Skorunun Hesaplanması .....	11
3.4 İstatistiksel Analiz .....	11
4. BULGULAR .....	13
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	24
6. KAYNAKLAR .....	28

## **KISALTMALAR**

- AUROC : Area under ROC curve
- ROC : Receiver operating characteristic
- ELF : Enhanced Liver Fibrosis
- HA : Hyaluronic acid
- TIMP-1 : Tissue inhibitors of metalloproteinases
- PIIINP : Amino-terminal propeptide of procollagen type III
- PINP : Human Procollagen Type I N-Terminal Propeptide
- MMPs : Matrix metalloproteinases
- DİA : Dijital imaj analizi
- ESM : Ekstrasellüler matriks
- FOA : Fibroz orantısal alan
- KC : Karaciğer
- KHB : Kronik hepatit B
- KHC : Kronik hepatit C
- DM : Diyabetes mellitus
- HT : Hipertansiyon
- HL : Hiperlipidemi
- NPV : Negative Predictive value
- OA : Orantısal alan
- PPV : Pozitif predictive value
- ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
- KKH : Kronik Karaciğer Hastalığı

## ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Knodell Histopatolojik Skorlama Sistemi .....	4
Tablo 2. İshak Histopatolojik Skorlama Sistemi .....	4
Şekil 1. DİA ile FOA hesaplanması .....	6
Tablo 3. Demografik özellikler .....	13
Tablo 4. ELF class kesim değerleri .....	14
Tablo 5. Hasta ve sağlıklı grupta ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP sonuçları .....	14
Şekil 2. Hasta ve sağlıklı grupta ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP'ın Independent Samples T-Test ile değerlendirilmesi .....	15
Tablo 6. ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP değerlerinin hasta ve sağlıklı grupta AUROC değerlerinin değerlendirilmesi .....	16
Şekil 3. ELF skorun ROC eğrisi .....	16
Tablo 7. ELF skorunun Knodell ve İshak fibroz evrelerinde AUROC değerlerinin karşılaştırılması .....	17
Tablo 8. Serum HA düzeyinin Knodell ve İshak'a göre değerlendirilmesi .....	18
Tablo 9. ELF class, Knodell ve İshak'a göre değerlendirilmesi .....	19
Tablo 10. ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP değerlerinin farklı Knodell evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi .....	20
Tablo 11. ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP değerlerinin farklı İshak evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi .....	21
Tablo 12. ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP'ın DIA tip1 kollajen OA, DIA tip3 kollajen OA ile Knodell fibroz evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi .....	22
Tablo 13. ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP'ın DIA tip1 kollajen OA, DIA tip3 kollajen OA ile İshak fibroz evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi .	23
Tablo 14. Serum-doku tip1-tip3 kollajen ilişkisi .....	23



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Karaciğer (KC) fibrozisi, kronik karaciğer hasarını sınırlamak için, moleküler, hücresel, dokusal düzeyde birbiri ile dinamik ve bütünleşmiş biçimde çalışan ilerleyici ekstraselüler matriks birikimi ile giden bir süreçtir(1-3).

KC'de aşırı ekstraselüler matriks birikimi, hepatik fibrogenik ve fibrolitik aktivitelerin dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. Ekstraselüler matrikste aynı zamanda niteliksel değişimler de meydana gelir; hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu ile Disse aralığının subendotelyal kısmındaki ekstraselüler matriksin kollajen IV, heparan sulfat proteoglikanı ve lamininden oluşan birleşimi, fibril oluşturan kollajenler olan kollajen I ve kollajen III'den oluşan birleşime doğru değişmeye başlar(4). Tip I Kollajen , fibrotik KC'de fibril oluşturan matriksin temel yapıtaşıdır(3). Normal KC'de tip I/III kollajen oranı 1 civarındayken, fibrotik KC'de bu oran 2'ye yükselir. Total kollajen oranı 3-10 kat artar. Önemli bir diğer değişiklik de fibrotik matriksin yıkılmasından sorumlu olan kollajenazların aktivitesindeki azalmadır.

Kronik karaciğer hastalığı klinik manifestasyonları ve karaciğer disfonksiyonu fibrozisin ilerlemesinin sonucu olan parankimin yapısal değişimlerine eşlik eder. Etiyolojide viral hepatitler, alkolik hepatit, toksik hepatit, otoimmün hepatit gibi hastalıklar yer almaktadır. KKH'da tanısal seyir ve tedaviye cevap için en önemli gösterge fibrozisin ve yapısal değişimlerin derecesinin belirlenmesidir. KC fibrozisin değerlendirilmesinde KC iğne biyopsisi hala altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, biyopsi girişimsel, ağrılı, pahalı olup, kullanımında sınırlamalar bulunmaktadır. KC fibrozisi değerlendirilirken; KC biyopsi alanının doğruluğu, örnekleme hatası ve gözlemcilerin çeşitliliği gibi pek çok faktör tarafından etkilenir. Ayrıca, kronik hepatitlerde ve otoimmün hepatitlerde, hastalığın ilerlemesinin tekrar değerlendirilmesi gerektiğinde yeniden biyopsi yapılması söz konusu olmakta, bu durum da hastalar tarafından kolayca tolere edilememektedir(5-12). Karaciğer biyopsisindeki bu sınırlamalar, karaciğer fibrozisini ölçmede non-invaziv yöntemlerin ortaya çıkarılması gerekliliğini doğurmaktadır(13).

ELF Test yeni non-invaziv bir test olup, içinde hyaluronik asit (HA), prokollajen III N-terminal propeptit (PIINMP) ve metaloproteinaz doku inhibitörü 1 (TIMP-1) belirteçleri yer alan, serumdan ELIZA yöntemi ile çalışılan ve belli bir algoritma ile ELF skor hesaplanan bir non-invaziv tanı yöntemidir.

KC dokusundaki fibrozisi ölçmede bir başka alternatif ve pratik yol olarak morfometrik analiz karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem histolojik kesitlerin fibrozisini, imajları üzerinden bilgisayarlı dijital imaj analizi (DİA) ile morfolojik olarak ölçen bir metottur. DİA fibrozis ve doku alanlarını ölçmek için dijital imajların segmentasyonu ve pixel sayma teknolojisini kullanır, fibroz alanı ve geri kalan KC alanını hesaplar, sonuçta fibroz alanının tüm hepatik alana oranını, yani “fibroz orantısal alanını” (FOA) hesaplar.

Bu çalışmada, birincil amaç olarak bizim popülasyonumuzda KC biyopsisi ile tanısı kesinleştirilmiş KC fibrozisli hastalarda ELF test yönteminin KC fibrozisini göstermedeki doğruluğunun araştırılması (validasyon), ikincil amaç olarak da KC fibrozisli hastalarda DİA ile tip1 ve tip3 kollajenin doku düzeyleri hesaplanarak elde edilen FOA değerlerinin serumda ölçülen tip1 ve tip3 kollajen değerleri ile korelasyon gösterip göstermediğini araştırmak belirlenmiştir. Bu doğrultuda invaziv yöntemle başvurmadan KC hastalığının derecesi ve fibrozis evresini belirlemek için serumda bakılan belirteçlerin etkinliği ortaya konabilecektir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

Karaciğer fibrozisinin değerlendirilmesinde günümüzde altın standart halen histopatolojik değerlendirmedir. Bununla birlikte bazı yeni yöntemler klinik pratikte KC fibrozisini değerlendirmede yardımcı olmaktadır. KC fibrozisini değerlendirmede kullanılan yöntemler; KC iğne biyopsisi ile skrolama sistemleri, serumda fibrozis belirteçleri ve ilişkili algoritmaları (FibroTest), aspartat transaminaz–platelet oranı indeksi (APRI skoru), transient elastografi (FibroScan) ve gerçek zamanlı doku elastografisidir.

### **2.1 Skrolama Sistemleri**

Skrolama sistemlerinin tarihçesi, kronik hepatitlerin histolojik özelliklerinin potansiyel prognostik önemlerinin anlaşıldığı, Knodell ve arkadaşları(14) tarafından bir skrolama sistemine organize edildiği 1981'lere dayanır. Knodell “Histolojik Aktivite İndeksi” sisteminde, dört histopatolojik özelliğin her biri (periportal=köprüleşme nekrozu, intralobüler dejenerasyon/fokal nekroz, portal inflamasyon ve fibrozis) ayrı olarak değerlendirilip bir skor tahsis edilmiştir. Fibrozisin evresi yapısal değişimler, portal trakt ekspansiyon, portal-portal bağlantılar, portal-santral köprüler, septa ve nodül oluşumuyla değerlendirir (Tablo 1).

Güncel olarak sık kullanılan bir sistem olan Ishak “revize Knodell” sistemi(15) fibrozisi; normalden siroza uzanan 7 kategoride değerlendirmektedir ve potansiyel olarak daha fazla tanımlayıcı güce sahiptir (Tablo 2).

Tablo 1. Knodell Histopatolojik Skorlama Sistemi

- Knodell Histopatolojik Skorlama Sisteminin Fibrozis Evrelemesi

Evre	Knodell Skorlaması
0	Fibrozis yok
1	Fibroz portal ekspansiyon
3	Köprüleşme fibrozisi (portal-portal veya portal-santral bağlantılar)
4	Siroz

Tablo 2. İshak Histopatolojik Skorlama Sistemi

- İshak Histopatolojik Skorlama Sisteminin Fibrozis Evrelemesi

Evre	İshak Skorlaması
0	Fibrozis yok
1	Bazı portal alanlarda fibroz ekspansiyon, beraberinde kısa fibröz septalar olabilir veya olmayabilir
2	Portal alanların çoğunda fibroz ekspansiyon, beraberinde kısa fibroz septalar olabilir veya olmayabilir
3	Portal alanların çoğunda fibroz ekspansiyon, beraberinde tek tük portal-portal köprüleşme görülür
4	Portal alanların çoğunda fibroz ekspansiyon, beraberinde belirgin portal-portal ve portal-santral köprüleşme mevcut
5	Belirgin portal-portal ve portal-santral köprüleşme ve tek tük nodüller mevcut (inkomplet siroz)
6	Siroz

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22: 696-699.

Histopatolojik skorlamalarla evrelemenin fibrozisin miktarının değil, yapısal değişimin kategorik olarak tanımlaması fibrozis yorumunu bazı önemli noktalarda zorlaştırmaktadır. Knodell ve Ishak gibi sistemler kronik hepatit B (KHB) ve kronik hepatit C (KHC) ilaç çalışmalarında sıklıkla iki şey için kullanılmaktadır; 1- tedavi gruplarındaki histolojik özelliklerin belirlenmesi, 2- tedavi sonrası histolojik değişimleri değerlendirmek. Ancak histopatolojik skorlamalarda fibrozisin ilerleme ve gerileme sürecindeki ince niceliksel değişimlerde ayırım mevcut değildir. KHB ve

KHC'nin tedavileri arttıkça, hastalık sürecinin stabilizasyonu ve hatta regresyonunu net şekilde değerlendirebilecek yöntemlere ihtiyaç vardır.

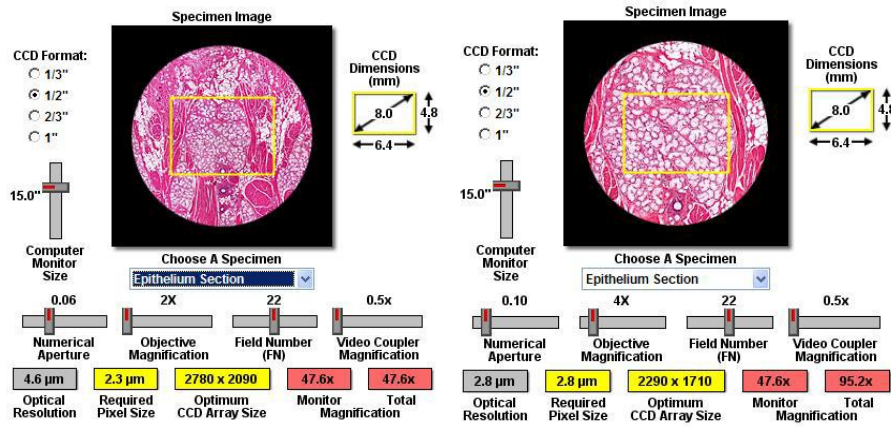
Günlük pratiğimizde KC biyopsilerinin histopatolojik skorlamalarını, tedavi endikasyonu kararlarını yönlendirmek amaçlı yaygın biçimde kullanmamıza rağmen, önemli şekilde, gözlemci-içi ve gözlemciler-arası hata olasılığının yüksekliğinden ötürü yanlış bir fikir uyandırmalarından, günlük klinik pratikteki değerlendirmelerimizde kullanılmasını önermeyen ciddi görüşler mevcuttur(16).

## 2.2 Morfometrik Yaklaşım

Fibrozisin rutin histolojik değerlendirmesi sıklıkla trikrom boyaması ile yapılmakta olup, kollajene selektif olmamaları ve gerçek hepatik kollajen miktarına karşılık gelmemeleri nedeni ile eleştirilmektedir(17). Sadece hepatik kollajen histolojik olarak değerlendirilecekse, öncelikle doku kollajeni spesifik olarak boyanmalıdır. Sirius kırmızısı hepatik kollajenlerin çoğuna, kollajen I ve III dahil (KC kollajeninin major komponentleri) affinite gösterir(18, 19).

KC dokusundaki fibrozisi ölçmede farklı bir yol olarak morfometrik analiz karşımıza çıkmaktadır. Histolojik kesitlerin fibrozisini, imajları üzerinden bilgisayarlı dijital imaj analizi (DİA) ile morfolojik olarak ölçen bir metottur. DİA fibrozis ve doku alanlarını ölçmek için dijital imajların segmentasyonu ve pixel sayma teknolojisini kullanır, fibroz alanı ve geri kalan KC alanını hesaplar. Sonuçta fibroz alanının tüm hepatik alana oranını, yani "fibroz orantısal alanını" (FOA) hesaplar (Şekil-1). Hepatik fibrozis için devamlılık gösteren bir skalada kantitatif bir ölçüm sağlamaktadır. Histopatolojik morfometrik analiz tekniği klinikte sık kullanılmamaktadır. Bu yöntemin, ölçüm-içi değişkenliğinin azlığı (low intraassay variability) ile kantitatif morfolojik yaklaşım için uygun olduğu düşünülmüştür(20, 21). Standardize edilirse gözlemci-içi ve gözlemciler arası değişkenliği belirgin azaltabileceği şeklinde yorumlar mevcuttur(22). Hayvan deneylerinde sıklıkla kullanılmakla beraber klinik pratikte yaygın olarak benimsenmemiştir(23, 24).

Goodman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada(25), KHC hastalarının interferon gamma-1b tedavisi öncesi ve sonrası alınmış KC biyopsileri fibrozisi kuantifiye etmek için bilgisayarlı morfometri ile analiz edilmiş ve Ishak patolojik skorlamasına göre fibrozis progresyonu morfometriyle daha hassas olarak gösterilebilmiştir. Normal insan karaciğeri yaklaşık 5.5mg/g kollajen içermekteyken, sirotik KC yaklaşık 30mg/g içerir(18). Buna karşılık gelecek şekilde çalışmalarda morfometriyle kollajen orantısal alanının (OA), normal KC de %2 civarı, KHC sirozunda ise %25'e kadar çıktığı gösterilmiştir(11, 16).



Şekil 1. DfA ile FOA hesaplanması

İmaj çekimi için kullanılan ekipman ayarlarının oluşturduğu imaj büyütme oranı 2x objektif için ayarlar girildiğinde yaklaşık 48 kat bir imaj büyütmesi oluşturmuştur, 4x objektif için girildiğinde ise yaklaşık 95 kat bir imaj büyütmesi oluşturmuştur.

(Dr.Ender Güneş Yeğin'in tez çalışmasından izni ile alınmıştır)

### 2.3 Fibrozisin Non-invaziv Değerlendirilmesi

Karaciğer biyopsisi fibrozis evrelemesi için "altın standart" olarak kabul edilmektedir(26). Son zamanlarda KC biyopsisi, fibrozis açısından altın standart değil, elimizdeki en iyi standart olarak nitelendirilmektedir(27). Fibrozisin histopatolojik değerlendirmesinin kalite ve güvenilirliğini biyopsi materyalinin büyüklüğü ve portal alan sayısı etkilemekte, bununla birlikte en az 20-25mm lik ve

11 portal alan içirme gereksinimleri pratikte her zaman karşılanamamaktadır. Bu büyüklükteki biyopsi materyali bile KC'in 1/50.000 ini temsil etmektedir. KC biyopsisi örnekleme hatalarına yatkındır, sağ-sol lob biyopsilerinin %38'sine varan bir oranı bir patolojik evreden fazla farklılık gösterebilmektedir(7, 26-28). Skorlamalardaki kategori sayısının azaltılması, gözlemciler-arası değişkenliği sınırlayabilir, ancak daha detaylı skorlamalardan edinilecek datanın kaybına neden olacaktır. İmaj analizi ile otomatik evrelemenin gözlemciler-arası değişkenliği azaltılabileceği öne sürülmüştür(17, 29).

Karaciğer biyopsisi işlemi morbidite ve hatta mortalite riskini beraberinde getirir. Komplikasyonların %1, mortalitenin %0.1-0.01 kadar olduğu bildirilmektedir. Bu risklerle beraber, örnek değişkenliği ve gözlemci-içi ve gözlemciler-arası hata olasılığı da düşünülerek, fibrozisi temsil edebilecek, hasta açısından da daha kabul edilebilir olabilen çeşitli görüntüleme teknikleri ve serolojik belirteçler geliştirilmeye çalışılmıştır.

Değişik non-invaziv yaklaşımların bazıları, serumda fibrozis belirteçleri ve ilişkili algoritmaları (FibroTest), aspartat transaminaz–platelet oranı indeksi (APRI skoru), transient elastografi (FibroScan) ve gerçek zamanlı doku elastografisidir(16).

### **2.3.1 Enhanced Liver Fibrosis (ELF) Test**

Hyaluronic acid (HA) karaciğer Stellat hücreleri tarafından üretilen bir glikosaminoglikandır, ekstraselüler matriksin bir birleşeni olup, öncelikle kan dolaşımı ile hepatik sinüzoidler tarafından temizlenir. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1) fibrogenezi arttıran matrix metalloproteinases (MMPs) aktivitesini inhibe eder. Amino-terminal propeptide of procollagen type III (PIIINP) hastalık seyrinde erken bir fibrogenez ve enflamasyon belirteci olup, kollajen sentezler. Bu üç molekül hep birlikte hücre dışı matrikste (ECM) oluşan nitel ve nicel değişikliklerle ilişkilidir. ECM, karaciğerin hücre dışı iskeletini oluşturan bir dizi makro molekülüdür. Bazı ECM belirteçleri fibrogenezi ve bazıları da fibroz regresyonunu yansıtarak, ECM aktivitesinin dinamik bir şekilde değerlendirilmesine

olanak tanır. Klinik pratikte bunların serum düzeyleri ölçülebilir. Sonuçların belli bir algoritmayla değerlendirilmesi ile diskriminant puan hesaplanabilir. Bu panel basitçe Enhanced Liver Fibrosis (ELF) skor olarak isimlendirilir. Bununla birlikte her bir serum belirtecinin yüksek serum konsantrasyonları yüksek ELF puanına sebep olur, bu da daha yüksek olasılıkla şiddetli fibrozisi gösterir. ELF testinin karaciğer fibrozis derecesinin değerlendirilmesinde, kolaylıkla tekrarlanabilir olması, çok daha az invaziv olması, daha otomatik ve kanıtlanmış önemli tanısal performans gibi birçok önemli yanları olması klinik önemini arttırmaktadır(30-42).

ELF testinin klinik çalışmalarında etkinliği gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Elektronik ortamda taranan 261 makale arasından seçilerek çalışmaya alınan 9 çalışma ile 2014 yılında yapılan bir meta analizde, Asya ve Avrupa'daki sağlık merkezlerinden toplam 1826 hasta değerlendirilmiştir. Çalışmada ELF testin karaciğer fibrozis derecesini yüksek oranda doğru şekilde belirlediği gösterilmiştir(43-47). Çalışmada özetle anlamlı fibrozis için AUROC değeri 0,8813, ileri fibrozis için AUROC değeri 0,8696 ve siroz için AUROC değeri 0,8770 bulunmuştur(43). (Çalışmada AUROC 1 ise çalışma mükemmel, 0,9-1 arası ise çok iyi, 0,8-0,9 arasında ise iyi olarak kabul edilir. ). Bu sonuçlara göre ELF testinin klinik pratikte siroz evrelemesi için iyi bir araç olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir. Son dönemde yayınlanan bir başka makalede ise ELF testinin Kronik HBV hastalarında prognozu belirlemede önemli bir parametre olduğu gösterilmiştir(48).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Etik Kurul ve BAPKO**

Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol no: 09.2014.0294). Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklendi (SAG-C-TUP-110315-0051).

#### **3.2 Çalışma Popülasyonu**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğinde veya Gastroenteroloji Enstitüsünde biyopsi ile tanısı kesinleştirilmiş karaciğer fibrozisi olan hastaların kayıtları incelenerek, 'ELF test skoru' hesaplamak için kan numunesi vermek amaçlı çalışmaya davet edilmiştir. Son 12 ay içerisinde KC biyopsileri alınmış hastaların bilgileri (yaş, cinsiyet, etiyoloji, Knodell ve Ishak skorlamalarını içeren patoloji raporları belirlenmesi), retrospektif olarak Aralık 2014 ve Şubat 2015 arasında hastane medikal data bazından, hasta dosyalarından, Endoskopi ve Girişimsel Radyoloji biyopsi kayıtlarından araştırmacı tarafından toplanmıştır. Bu şekilde çalışmaya 54 hasta (26 kadın, 28 erkek) dahil edilmiştir.

Çalışmaya aynı zamanda genel dahiliye polikliniğinde görülen, bilinen tanıli hastalığı olmayan ve yapılan tetkiklerinde (hemogram, biyokimya, viral seroloji) anormallik saptanmayıp sağlıklı kabul edilen kişilerde eklenmiştir. Sağlıklı gruba çalışmaya davet edilmeden önce detaylı şekilde çalışma hakkında bilgi verilerek, sözlü ve yazılı onam formu alındıktan sonra çalışmaya eklenmiştir. Çalışmaya 37 sağlıklı gönüllü (19 kadın, 18 erkek) dahil edilmiştir.

### **3.2.1 Çalışmaya dahil edilme - dışlanma kriterleri**

Dahil Edilme Kriterleri;

1. 18-76 yaş arası biyopsi kanıtlı karaciğer fibrozisi olan hastalar
2. 18-76 yaş arası bilinen tanıli hastalığı olmayan sağlıklı kişiler

Dışlama Kriterleri;

1. Biyopsi tarihinden itibaren 1 yıldan daha fazla süre geçmiş olan hastalar
2. Sistemik hastalığı (örn: DM, HT, HL gibi) bulunanlar
3. Alkol, sigara, uyuşturucu madde kullanımı bulunanlar
4. Gebeliği, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği ( $Cr > 1,4$ ) bulunanlar
5. Fe eksikliği anemisi veya akut ciddi inflamatuvar hastalığı bulunanlar

### **3.2.2 KC biyopsi ve DİA sonuçlarının toplanması**

Çalışmada kullanılan Knodell ve İshak skorlamaları yapılmış hasta datası ve DİA ile hesaplanan ayrı ayrı tip1 ve tip3 kollajen DİA FOA'ları daha önce Dr. Ender Yeğın Güneş tarafından hazırlanan Gastroenteroloji yan dal bitirme tezinde kullanılan hasta verileri olmuştur (BAPKO Proje no: SAG-A-130612-0201).

Morfometrik analiz ile FOA ölçümleri bir DİA programı ile (Media Cybernetics, Image-Pro Premier 9.2 software, Rockville, MD, USA) gerçekleştirilmiştir. Sonrasında DİA programı tarafından her bir bölgeye karşılık gelen piksellerin toplamı ve birbirlerine oranı (örn. trikrom piksel toplamları/trikrom+parankim piksel toplamları) hesaplanabilmiştir. Böylece, kantitatif bir analiz gerçekleştirilip, FOA yüzde olarak hesaplanabilmiştir.

### 3.3 ELF Test Skorunun Hesaplanması

Aydınlatılmış onam formunu imzalayıp çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen hasta ve sağlıklı bireylerden ELF testi ve Human Procollagen Type I N-Terminal Propeptide (PINP) ELISA testi için serum ayırmak amacıyla kuru tüpe 10 ml kan numunesi alınmıştır. Ayrılan serumlar çalışma gününe kadar Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji-İmmünoloji laboratuvarında bulunan -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışma günü serumlar eritilip kitlerin protokollerine göre çalışılmıştır. Otomatik ADVIA Centaur ELF testi (Siemens Healthcare Diagnostic Inc.) ELİZA prensibi ile çalışmaktadır.

ELF skoru hesaplamak için hasta ve sağlıklı kontrol serumları, standart kitlerin bulunduğu Siemens marka ADVIA Centaur Sistemi ile çalışıldı. Sonrasında ELF skoru, belirlenmiş algoritma ( $ELF \text{ skor} = 2.278 + 0.851 \ln(CHA) + 0.751 \ln(CP3NP) + 0.394 \ln(CTIMP1)$ ) kullanılarak cihaz tarafından otomatik olarak sayısal değerlerle hesaplandı. Cihaz, otomatik hesaplanmış ELF skoru ile beraber ayrı ayrı HA (kat. no:10493157), PIIINMP (kat. no:10492440) ve TIMP-1'in (kat. no:10631070) serum konsantrasyon değerlerini ng/mL cinsinden verdi. Ayrıca yine ELİZA yöntemi ile "Human Procollagen Type I N-Terminal Propeptide (PINP)"i (SunRed ELISA KIT kat. no:201-12-1351) ayrı bir test olarak çalışıldı ve sonuçlar ng/mL olarak hesaplandı.

### 3.4 İstatistiksel Analiz

Tüm data SPSS (versiyon 20.0; SPSS Inc, Chicago, IL) istatistik paketi ile analiz edilmiştir.

Çalışma hastalarının karakteristikleri, kategorik değişkenler için yüzdeler ve sürekliliği olan değişkenler için uygun olduğu şekilde ortalama ya da medyan olarak ifade edildi. Gruplar arasında sürekliliği olan medyan olan değişkenlerin karşılaştırılmasında non-parametrik Mann-Whitney U-testi ve Kruskal-Wallis testi, sürekliliği olan ortalama olan değişkenlerin karşılaştırılmasında parametrik

independent samples t- test ve one-way ANOVA testi, kategorik verinin karşılaştırılmasında 2 (chi-square) ve Fisher exact testi kullanıldı. Sayısal değerler arası korelasyon için Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analiz için, p değeri<0.05 anlamlı kabul edildi.

Histopatolojik skora karşılık gelen optimal ELF skor değeri ve bu kesim değerinin sensitivite, spesifisite, negatif prediktif değer (NPV), pozitif prediktif değer (PPV) ve yöntemin doğruluk (accuracy, AUROC) ölçümleri için ROC (Receiver Operating Curve) metodu kullanılmıştır.

ROC eğrisi gerçek pozitiflik oranı (sensitivite) ile yalancı pozitiflik (100-spesifisite) değerleri ile çizilen bir eğri olup, bu eğrinin altında kalan alana AUROC (area under ROC) denmektedir. AUROC bir testin hasta ve normal vakaları ayırmada doğruluğunu (accuracy) ya da gücünü (discriminative ability), yani bir testin tanısal performansını değerlendirir. AUROC (accuracy) 0.9-1 arası olan bir test mükemmel tanısal gücü olan bir test olarak nitelendirilirken, 0.9-0.8 arası iyi, 0.8-0.7 arası orta, 0.7-0.6 arası zayıf, 0.6-0.5 arası değersiz bir test olarak nitelendirilmektedir.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 54 hastanın 28'i erkek, 26'sı kadın, yaş ortalaması 49±13 (17-75), 37 sağlıklı grubun 19'u kadın, 18'i erkek, yaş ortalaması 29±8 (18-56) dir. Hasta grubunun etiyolojisi; 35 KHB, 17 KHC, 2 Otoimmün Hepatit idi. Hastaların Knodell'e göre dağılımı F0: 5 (%9), F1: 18 (%33), F3: 25 (%46), F4: 6 (%11), İshak'a göre dağılımı F0: 5 (%9), F1: 5 (%9), F2: 13 (%24), F3: 17 (%31), F4: 8 (%14), F5: 0, F6: 6 (%11) (Tablo 3). Knodell'e göre anlamlı fibrozisi (F1-F3-F4) olan 49 hasta, ileri fibrozisi (F3-F4) olan 31 hasta mevcuttu. İshak'a göre anlamlı fibrozisi olan (F2-F3-F4-F5-F6) 44 hasta, ileri fibrozisi olan (F4-F5-F6) 14 hasta mevcuttu.

Tablo 3. Demografik özellikler

Karakteristik	Hastalar n=54	Sağlıklılar n=37
Cinsiyet (E/K)	28/26	18/19
Yaş (yıl)	49±13	29±8
Etiyoloji (KHB/KHC/OİH)	35/17/2	
Knodell F0/F1/F3/F4 %	5/18/25/6 9/33/46/11	
Ishak F0/F1/F2/F3/F4/F5/F6 %	5/5/13/17/8/0/6 9/9/24/31/14/0/11	

Karaciğer biyopsisi alınıp Knodell ve Ishak skorlamaları yapılmış 54 hasta ile 37 sağlıklı gönüllünün ELF skoru, ayrı ayrı serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP değerleri hesaplandı. Hasta grubundan 2 hasta ve sağlıklı gruptan 1 kişinin çalışma esnasında sistem hatası nedeniyle ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP değerleri hesaplanamadı. ELF skoru hesaplanan hastalar Siemens tarafından belirlenen referans değerlere (tablo 4) göre hafif-orta-ileri olarak sınıflandırıldı. Biz çalışmamızda bu sınıflandırmayı ELF class olarak adlandırdık.

Tablo 4. ELF class kesim değerleri

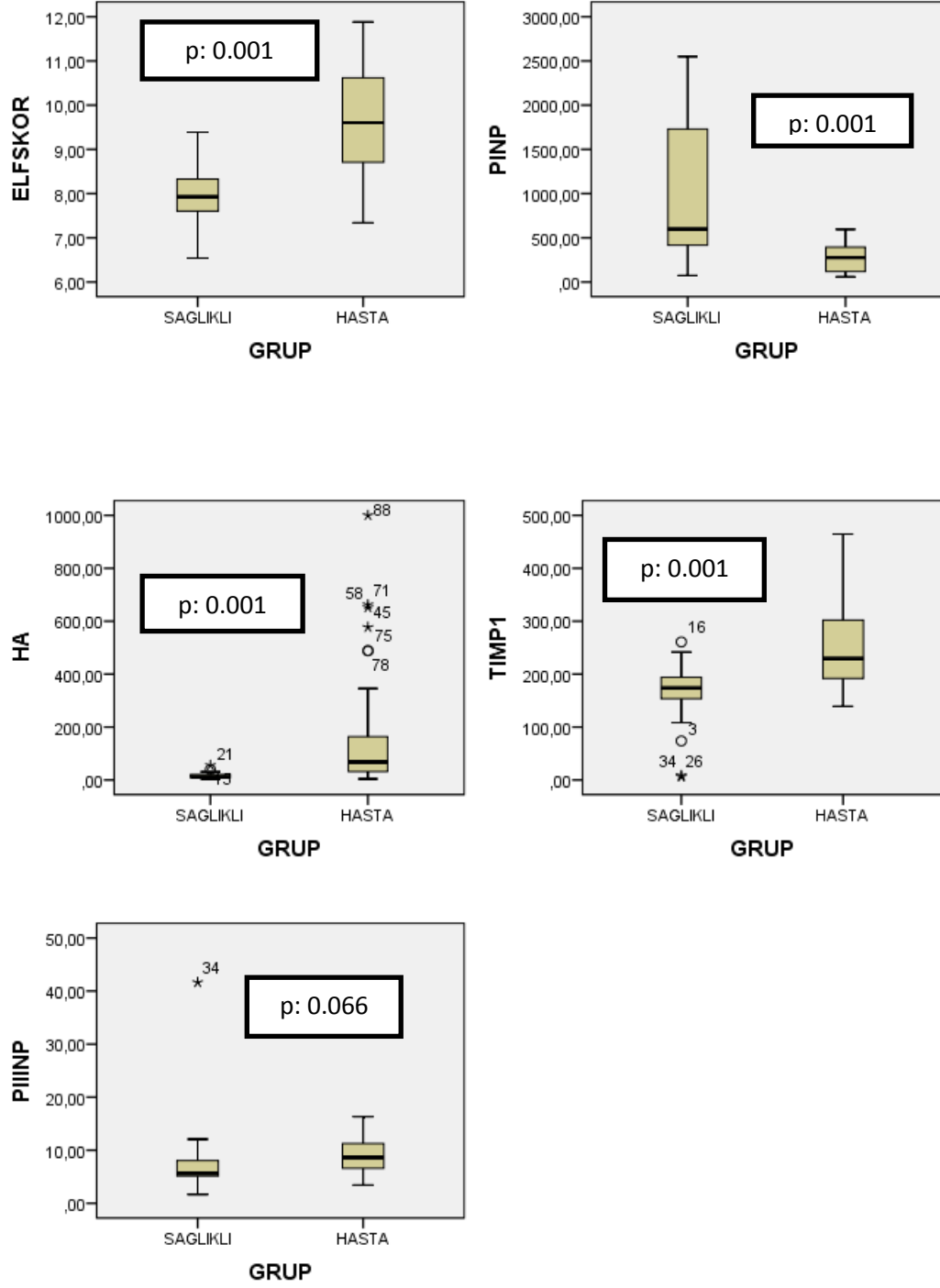
ELF Kesim Değeri	Karaciğer Fibrozisinin Ciddiyeti
<7,7	Yok veya hafif
≥7,7 - <9,8	Orta seviye
≥9,8	Ciddi

Çalışmamızda her iki grupta (hasta ve sağlıklı) ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP sonuçlarının tanımlayıcı bilgileri (tablo-5) verilmiştir.

Tablo 5. Hasta ve sağlıklı grupta ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP sonuçları

Test	Hastalar n=52	Sağlıklılar n=36
<b>ELF SKOR</b>	9,71±1,23	7,91±0,62
<b>min-max</b>	7,34-11,88	6,54-9,39
<b>HA (ng/mL)</b>	151,71±204,83	16,51±10,55
<b>min-max</b>	4,50-1000,00	4,57-55,61
<b>TIMP1 (ng/mL)</b>	257,86±82,29	167,72±53,71
<b>min-max</b>	139,10-464,50	6,00-260,90
<b>PIIINP (ng/mL)</b>	9,23±3,27	7,36±6,21
<b>min-max</b>	3,43-16,34	1,67-41,63
<b>PINP (ng/mL)</b>	270,17±152,75	1061,38±820,00
<b>min-max</b>	58,70-595,00	72,80-2550,00

Kısaltmalar: min: Minimum, max: Maksimum



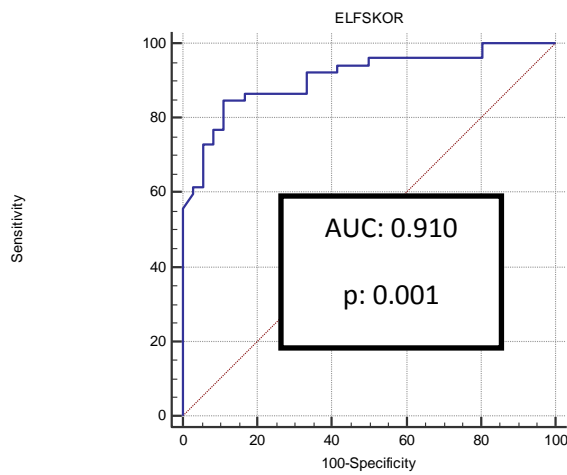
Şekil 2. Hasta ve sağlıklı grupta ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP'ın Independent Samples T-Test ile değerlendirilmesi

Çalışmamızda ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP değerlerini hasta ve sağlıklılar arasında karşılaştırılarak hesaplanan AUROC değerleri tablo-6 da gösterilmiştir.

Tablo 6. ELF skoru, HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP değerlerinin hasta ve sağlıklı grupta AUROC değerlerinin değerlendirilmesi

Test n=88	Kesim Değeri	Sensitivite %	Spesifisite %	AUROC
<b>ELF skor</b>	>8,41	84,62	88,89	0,910
<b>HA</b>	>31,1	75,00	94,44	0,908
<b>TIMP1</b>	>180,9	86,54	66,67	0,835
<b>PIIINP</b>	>5,88	84,62	55,56	0,743
<b>PINP</b>	≤394	76,92	88,89	0,878

Ayrıca ELF skorun ROC eğrisi grafiği (şekil 4) de gösterilmiştir.



Şekil 3. ELF skorun ROC eğrisi



ELF testinin Knodell ve İshak skorlamalarına göre anlamlı ve ileri derecede fibrozis grubunda ayrı ayrı AUROC değerleri hesaplanarak tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7. ELF skorunun Knodell ve İshak fibroz evrelerinde AUROC değerlerinin karşılaştırılması

Evre	n=poz/top grup	KESİM DEĞERİ	Sensitivite %	Spesifisite %	AUROC
<b>Knodell</b>					
≥F1	47/88	>8,41	87,23	82,93	0,900
≥F3	29/88	>9,47	65,52	84,75	0,812
F4	4/88	>9,76	100,00	77,38	0,914
<b>İshak</b>					
≥F1	47/88	>8,41	87,23	82,93	0,900
≥F2	42/88	>8,41	88,10	76,09	0,872
≥F3	29/88	>9,47	65,52	84,75	0,812
≥F4	12/88	>9,47	75,00	75,00	0,791
F6	4/88	>9,76	100,00	77,38	0,914

Kısaltmalar: poz:pozitif, top: toplam,

HA serum testinin Knodell ve İshak skorlamalarına göre anlamlı ve ileri derecede fibrozis grubunda ayrı ayrı AUROC değerleri hesaplanarak tablo 8’de özetlenmiştir.

Tablo 8. Serum HA düzeyinin Knodell ve İshak’a göre değerlendirilmesi

Evre	n=poz/top grup	KESİM DEĞERİ	Sensitivite %	Spesifisite %	AUROC
<b>Knodell</b>					
≥F1	47/88	>39,41	72,34	92,68	0,902
≥F3	29/88	>63,39	65,52	86,44	0,824
F4	4/88	>160,3	100,00	89,29	0,970
<b>İshak</b>					
≥F1	47/88	>39,41	72,34	92,68	0,902
≥F2	42/88	>55,61	66,67	93,48	0,875
≥F3	29/88	>63,39	65,52	86,44	0,824
≥F4	12/88	>71,34	75,00	80,26	0,819
F6	4/88	>160,3	100,00	89,29	0,970

Kısaltmalar: poz:pozitif, top: toplam,

Son olarak ELF testinin tanısal anlamda gücünü göstermede gold standart olarak Knodell ve İshak sonuçları alınarak, ELF class diagnostic test (2x2 table) sonuçları ayrı ayrı her bir fibroz evresine göre değerlendirilmiştir (tablo 9).

Tablo 9. ELF class, Knodell ve İshak'a göre değerlendirilmesi

	n=poz/top grup	Kesim Sınıfı	Sensitivite %	Spesifisite %	AUROC
<b>Knodell</b>					
≥F1	47/88	None/ Mod+sev	97,87	34,15	0,66
F4	4/88	None+mod/ sev	100,00	77,38	0,89
<b>İshak</b>					
≥F1	47/88	None/ Mod+sev	97,87	34,15	0,66
≥F4	12/88	None+mod/ sev	66,67	80,26	0,73
F6	4/88	None+mod/ sev	100,00	77,38	0,89

Kısaltmalar: poz:pozitif, top: toplam,

Knodell ve Ishak sınıflamasına göre anlamlı ve ileri derecede fibrozisi olan hasta gruplarında ayrı ayrı ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP sonuçları sayısal değerler arası korelasyon için Spearman korelasyon testi uygulanarak tablo 10 ve tablo 11 de özetlenmiştir.

Tablo 10. ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP değerlerinin farklı Knodell evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi

	<b>Knodell</b>	<b>Elf Skor</b>	<b>HA</b>	<b>PIIINP</b>	<b>PINP</b>	<b>TIMP1</b>
<b>Elf Skor</b>	≥ F1 n=47	rs=1	rs=0,666 p=0,001	rs=0,752 p=0,001	rs=0,489 p=0,001	rs=0,647 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=1	rs=0,663 p=0,001	rs=0,760 p=0,001	rs=0,586 p=0,001	rs=0,621 p=0,001
<b>HA</b>	≥ F1 n=47	rs=0,666 p=0,001	rs=1	rs=0,564 p=0,001	rs=0,511 p=0,001	rs=0,532 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,663 p=0,001	rs=1	rs=0,570 p=0,001	rs=0,613 p=0,001	rs=0,627 p=0,001
<b>PIIINP</b>	≥ F1 n=47	rs=0,752 p=0,001	rs=0,564 p=0,001	rs=1	rs=0,386 p=0,007	rs=0,562 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,760 p=0,001	rs=0,570 p=0,001	rs=1	rs=0,470 p=0,10	rs=0,502 p=0,006
<b>PINP</b>	≥ F1 n=47	rs=0,489 p=0,001	rs=0,511 p=0,001	rs=0,386 p=0,007	rs=1	rs=0,269 p=0,068
	≥ F3 n=29	rs=0,586 p=0,001	rs=0,613 p=0,001	rs=0,470 p=0,10	rs=1	rs=0,431 p=0,019
<b>TIMP1</b>	≥ F1 n=47	rs=0,647 p=0,001	rs=0,532 p=0,001	rs=0,562 p=0,001	rs=0,269 p=0,068	rs=1
	≥ F3 n=29	rs=0,621 p=0,001	rs=0,627 p=0,001	rs=0,502 p=0,006	rs=0,431 p=0,019	rs=1

Kısaltmalar: rs, Spearman korelasyon katsayısı

Tablo 11. ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP değerlerinin farklı İshak evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi

	İshak	Elf Skoru	HA	PIIINP	PINP	TIMP1
<b>Elf Skoru</b>	≥ F2 n=42	rs=1	rs=0,659 p=0,001	rs=0,754 p=0,001	rs=0,506 p=0,001	rs=0,615 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=1	rs=0,663 p=0,001	rs=0,760 p=0,001	rs=0,586 p=0,001	rs=0,621 p=0,001
<b>HA</b>	≥ F2 n=42	rs=0,659 p=0,001	rs=1	rs=0,556 p=0,001	rs=0,506 p=0,001	rs=0,518 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,663 p=0,001	rs=1	rs=0,570 p=0,001	rs=0,613 p=0,001	rs=0,627 p=0,001
<b>PIIINP</b>	≥ F2 n=42	rs=0,754 p=0,001	rs=0,556 p=0,001	rs=1	rs=0,378 p=0,014	rs=0,555 p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,760 p=0,001	rs=0,570 p=0,001	rs=1	rs=0,470 p=0,10	rs=0,502 p=0,006
<b>PINP</b>	≥ F2 n=42	rs=0,506 p=0,001	rs=0,506 p=0,001	rs=0,378 p=0,014	rs=1	rs=0,273 p=0,080
	≥ F3 n=29	rs=0,586 p=0,001	rs=0,613 p=0,001	rs=0,470 p=0,10	rs=1	rs=0,431 p=0,019
<b>TIMP1</b>	≥ F2 n=42	rs=0,615 p=0,001	rs=0,518 p=0,001	rs=0,555 p=0,001	rs=0,273 p=0,080	rs=1
	≥ F3 n=29	rs=0,621 p=0,001	rs=0,627 p=0,001	rs=0,502 p=0,006	rs=0,431 p=0,019	rs=1

Kısaltmalar: rs, Spearman korelasyon katsayısı

Karaciğer biyopsisi ile trikrom boyası mevcut 54 hastanın 52'sinin aynı zamanda kollajen I ve III boyası kullanılarak DİA ile hesaplanan FOA değerleri mevcuttu. Bu 52 hastanın 50'sinin aynı zamanda ELF skoru, serum HA, TIMP-1, PIIINP ve PINP sonuçları da mevcuttu. Bu 50 hastada Knodell ve Ishak sınıflamasına göre anlamlı ve ileri derecede fibrozisi olan hasta gruplarında ayrı ayrı ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP, DIA Tıp-1 kollajen OA, DIA Tıp-3 kollajen OA, sonuçları sayısal değerler arası korelasyon için Spearman korelasyon testi uygulanarak tablo 12 ve tablo 13 de özetlenmiştir.

Tablo 12. ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP'in DIA tip1 kollajen OA, DIA tip3 kollajen OA ile Knodell fibroz evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi

	<b>Knodell</b>	<b>KollajenI DIA</b>	<b>KollajenIII DIA</b>
<b>Elf Skor</b>	≥ F1 n=45	rs=0,327, p=0,029	rs=0,333, p=0,026
	≥ F3 n=27	rs=0,463, p=0,015	rs=0,438, p=0,022
<b>HA</b>	≥ F1 n=45	rs=0,689, p=0,001	rs=0,697, p=0,001
	≥ F3 n=27	rs=0,754, p=0,001	rs=0,747, p=0,001
<b>PIIINP</b>	≥ F1 n=45	rs=0,450, p=0,002	rs=0,456, p=0,002
	≥ F3 n=27	rs=0,509, p=0,007	rs=0,491, p=0,009
<b>PINP</b>	≥ F1 n=47	rs=0,549, p=0,001	rs=0,542, p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,606, p=0,001	rs=0,602, p=0,001
<b>TIMP1</b>	≥ F1 n=45	rs=0,296, p=0,048	rs=0,314, p=0,036
	≥ F3 n=27	rs=0,451, p=0,018	rs=0,450, p=0,019

Kısaltmalar: rs, Spearman korelasyon katsayısı

Tablo 13. ELF skoru, serum HA, TIMP-1,PIIINP ve PINP'in DIA tip1 kollajen OA, DIA tip3 kollajen OA ile İshak fibroz evrelerine göre korelasyon değerlendirmesi

	<b>İshak</b>	<b>KollajenI DIA</b>	<b>KollajenIII DIA</b>
<b>Elf Skoru</b>	≥ F2 n=40	rs=0,355, p=0,025	rs=0,347, p=0,028
	≥ F3 n=27	rs=0,463, p=0,015	rs=0,438, p=0,022
<b>HA</b>	≥ F2 n=40	rs=0,708, p=0,001	rs=0,710, p=0,001
	≥ F3 n=27	rs=0,754, p=0,001	rs=0,747, p=0,001
<b>PIIINP</b>	≥ F2 n=40	rs=0,452, p=0,003	rs=0,448, p=0,004
	≥ F3 n=27	rs=0,509, p=0,007	rs=0,491, p=0,009
<b>PINP</b>	≥ F2 n=42	rs=0,527, p=0,001	rs=0,520, p=0,001
	≥ F3 n=29	rs=0,606, p=0,001	rs=0,602, p=0,001
<b>TIMP1</b>	≥ F2 n=40	rs=0,329, p=0,038	rs=0,331, p=0,037
	≥ F3 n=27	rs=0,451, p=0,018	rs=0,450, p=0,019

Kısaltmalar: rs, Spearman korelasyon katsayısı

Çalışmamızın bir diğer amacı da doku - serum tip1 ve tip3 kollajen arasındaki korelasyonu göstermektir. Serum tip1 ve tip3 konsantrasyonları ile DIA tip1 kollajen OA, DIA tip3 kollajen OA sonuçları sayısal değerler arası korelasyon için Spearman korelasyon testi uygulanarak tablo 14 de özetlenmiştir.

Tablo 14. Serum-doku tip1-tip3 kollajen ilişkisi

	<b>n=</b>	<b>KollajenI DIA</b>	<b>KollajenIII DIA</b>
<b>PIIINP</b>	50	rs=0,437, p=0,001	rs=0,441, p=0,001
<b>PINP</b>	52	rs=0,489, p=0,001	rs=0,481, p=0,001

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda karaciğer fibrozisinin değerlendirilmesinde non-invaziv yöntemlerin önemi araştırılmıştır. Bilindiği gibi karaciğer fibrozisi klinikte çok sık karşımıza çıkmaktadır. Gerek tanısal, gerek de tedavi yaklaşımı açısından fibrozisi ortaya koymak kolay olmamaktadır. KC'deki fibrozisinin değerlendirilmesinde KC iğne biyopsisi hala altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, biyopsi girişimsel, ağrılı, pahalı olup, kullanımında sınırlamalar bulunmaktadır. KC fibrozisi değerlendirilirken; KC biyopsi alanının doğruluğu, örnekleme hatası ve gözlemcilerin çeşitliliği gibi pek çok faktör tarafından etkilenir(5-12).

Histopatolojik skorlamalarda fibrozisin ilerleme ve gerileme sürecindeki ince niceliksel değişimlerde ayırım mevcut değildir. KHB ve KHC'nin tedavileri arttıkça, hastalık sürecinin stabilizasyonu ve hatta regresyonunu net şekilde değerlendirebilecek yöntemlere ihtiyaç vardır. Tam bu noktada ELF test yeni non-invaziv bir test olup, tanı ve tedavi yaklaşımı açısından son derece önemlidir. Bu çalışmamızın bir amacı da ELF testinin bizim hasta popülasyonu için validasyonunu yapmaktır.

Çalışmamızda ELF testin sağlıklı ve hastayı ayırmada doğruluğu çok iyi (AUROC: 0,910, duyarlılık: %84, özgüllük: %89) olarak bulundu. Diğer yandan ELF testin bir bileşeni olan HA'nın da (AUROC: 0.908, duyarlılık %75, özgüllük %94,4) tek başına KC fibrozisinde sağlıklı ve hasta ayırımında ELF test kadar güçlü olduğu gösterildi(Tablo-5). ELF test ve HA karşılaştırıldığında; HA, ELF teste göre duyarlılığı daha düşük olmasına rağmen özgüllüğü fazladır. Bu sonuçlar da bize belki de ELF test yerine sadece HA bakmanın önemli derecede maliyet etkin yöntem olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ELF testinin İshak ve Knodell histopatolojik skorlamalarına göre farklı fibrozis evrelerinde değerlendirmesi yapılmıştır. Her bir fibrozis evresine göre farklı kesim değerleri elde ettik (tablo-10). Anlamli fibrozisi saptamada (İshak  $\geq$ F2, Knodell  $\geq$ F1) ELF skor kesim değeri 8,41 için ELF testin anlamli fibrozisi



göstermede (AUROC: 0,90, duyarlılık %87, özgüllük %82 ) çok iyi olduğu görülmüştür (tablo-10). Aynı şekilde ileri derecede fibrozisi (İshak  $\geq$ F4, Knodell  $\geq$ F3) saptamada ELF skor kesim değeri 9,47 için ELF testin ileri derecede fibrozisi göstermede (AUROC: 0,79-0,81, duyarlılık %75-65, özgüllük %75-84 ) iyi olduğu görülmüştür. Siroz (İshak F6, Knodell F4) için kesim değeri 9,76 alındığında testin gücü (AUROC: 0,914, duyarlılık %100, özgüllük %77 ) çok iyi olarak görülmüştür. Sonuçlara bakıldığında ELF testin fibroz derecesinin her iki ucunda tanısal gücü daha fazladır. Hasta ve sağlıklı ayırımı yapmada ve sirozu göstermede tanısal gücü 0,9-1 aralığındadır.

Wahl, K. ve arkadaşlarının 2012 yılında Almanya'da 102 hasta ile yaptığı çalışmada İshak skorlamasına göre (hasta dağılımı F0-F1: %66, F2-F4: %22, F5-F6: %11) İshak  $\geq$ F2 kesim değeri 8,99 için AUROC: 0,87, duyarlılık %86, özgüllük %70 olarak gösterilmiştir(43). Bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında kesim değeri 8,41 alındığında AUROC: 0,90, duyarlılık %87, özgüllük %82 olarak bulunmuştur.

Lichtinghagen, R. ve arkadaşlarının 2013 yılında Almanya'da yaptığı çalışmada İshak skorlamasına göre (hasta dağılımı F0: %26; F1-2: %24; F3-F4: %12; F5-F6: %36) İshak  $\geq$ F3 kesim değeri 9,8 için AUROC: 0,95; duyarlılık %84; özgüllük %75 olarak gösterilmiştir(43). Bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında kesim değeri 9,47 alındığında AUROC: 0,81, duyarlılık %65, özgüllük %84 olarak bulunmuştur. AUROC değerinin çalışmamızda daha düşük olmasını grubumuzdaki  $\geq$ F3 olan örneklerin 1/3 oranında olması ile ilişkilendirebiliriz (diğer çalışmada 1/2 oranında).

Yukarıda belirtilen iki çalışmada da gösterildiği üzere ELF testin tanısal gücü son derece iyidir. Fakat her tanısal test de olabileceği gibi ELF testinde bazı kısıtlamaları mevcuttur. ELF testin kendi prospektüsünde belirtilen kesim değerleri fibrozisin yok veya hafif için  $<7,7$ , ciddi fibrozis için  $\geq 9,8$ , orta seviye için ara değerler kabul edilmiştir. Çalışmamızda sağlıklı grubun ELF skor ortalaması 7,91 dir. ELF test kesim değerlerine göre sağlıklı grupta 13 kişi yok veya hafif fibroz ( $<7,7$ ), 23 kişi orta fibroz ( $>7,7- \leq 9,8$ ) grubunda yer aldı. Joo, EJ. ve arkadaşları Kuzey Kore'de sağlıklı karaciğer donörü olup, rutin sağlık taraması için başvuran 183 kişide ELF test çalışmışlar. Sağlıklı popülasyonda ELF test aralığı 5.95-8.73

bulmuşlar(43). Bizim çalışmamızda ELF test aralığı 6.54-9.39 bulundu. Bu da testin kesim değerlerinin çalışma popülasyonlarına göre tekrar değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda kesim değeri 8,41 alındığında sağlıklı ve hastaları ayırmada testin doğruluk gücü daha iyidir. Bu durumda bizim popülasyonumuz için yukarıda belirttiğimiz değerleri göz önüne almak daha uygun olacaktır. Bu sonuca göre ELF testinin daha geniş bir popülasyonda Türk halkı için valide edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

ELF testin diğer yöntemlerle korelasyonuna bakıldığında, PIIINP ve HA serum düzeylerinin anlamlı farkla korele olduğu saptandı. Artan fibrozis değerlerinde korelasyonun devam ettiği görüldü (tablo-8). Özellikle Knodell  $\geq$  F3 ve İshak  $\geq$  F3 evrelerinde ELF testi ile PIIINP arasındaki korelasyon (rs: 0.760 p: 0.001) en yüksek düzeyde saptandı. HA içinde Knodell  $\geq$  F1 evresinde anlamlı korelasyon (rs: 0.666 p: 0.001) saptandı. Bu da zaten beklediğimiz bir sonuçtu. Ancak daha ilginç olan bir sonuç ise HA'nın hasta-sağlıklı ayırımında (AUROC: 0.908, duyarlılık %75, özgüllük %94,4) tek başına çok iyi olduğunu saptamamızdır. Tartışmamızda önceden de bahsettiğimiz gibi HA'nın ELF testi kadar güçlü olması maliyet etkinlik kapsamında tek başına kullanımını daha avantajlı yapabilir. Ancak bu testin de kendi popülasyonumuzda daha çok sayıda birey üzerinde tekrar valide edilmesi gerekliliği vardır.

Çalışmamızda bir başka amacımız karaciğer dokusunda artmış bulunan tip1 ve tip3 kollajenin serumda da aynı artışı gösterip göstermediğini araştırmaktır. Bu şekilde non-invaziv olarak serum kollajen düzeylerini belirlemenin karaciğer fibrozisini ne kadar gösterdiğini araştırmak istenmiştir. Çalışmamızda DİA tip1 ve tip3 kollajen OA'ları ile serum tip1 ve tip3 kollajen korelasyonu ve buna ek olarak fibrozis değerlerinde kollajen tip1 ve tip3 tanısallık etkinliği incelenmiştir. Sırasıyla tip 3 ve tip1 kollajenin anlamlı fibrozisi saptamada Knodell  $\geq$ F1 için; (AUROC: 0.717;0,836, duyarlılık %85;75, özgüllük %50;82), İshak  $\geq$ F2 için; (AUROC: 0.697;0,773, duyarlılık %50;72, özgüllük %82;73). Sırasıyla tip3 ve tip1 kollajenin ileri fibrozisi saptamada Knodell  $\geq$ F3 için; (AUROC: 0.708;0,692, duyarlılık %44;70, özgüllük %90;62), İshak  $\geq$ F4 için; (AUROC: 0.687;0,630, duyarlılık %58;85, özgüllük %84;53) saptandı. DİA tip1 kollajen OA'ları ile tip1 kollajen

korelasyonu: rs:0.489 p:0.001, DİA tip3 kollajen OA'ları ile tip3 kollajen korelasyonu: rs:0.441 p:0.001 (Tablo 12). Sonuçta serum ve doku tip1-3 kollajen değerleri anlamlı farkla orta dereceli korale olduğu saptandı. Bu sonuçlarımıza göre tek başına serum kollajen tip1 ve tip3 değerlerinin tanısallık anlamlılığı çok kuvvetli değildir. Pahalı olması ve uygulama zorluğu nedeni ile tek başına kullanımlarını bu sonuçlara göre önermek olası görülmemektedir.

Sonuç olarak ELF test fibrozis tanısında son derece başarılı (AUROC: 0,910, duyarlılık: %84, özgüllük: %89) non-invaziv bir tanı yöntemidir. Özellikle fibrozis arttıkça ileri fibrozis evrelerinde doğruluğu (AUROC: 0,914, duyarlılık %100, özgüllük %77 ) daha da artmaktadır. Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirken bir takım kısıtlamalar mevcuttur. Bunlardan biri kısıtlı popülasyonda çalışmış olmamız, diğeri de hasta grubunda fibrozis evrelerinin homojen dağılmamasıdır. Çalışmamızda ELF testin ileri derecede fibrozis evrelerinde her ne kadar başarısı yüksek çıksa da, homojen olmayan hasta grubu ve az olan örneklem içinde (ishak F6: 6, ishak F5: 0, Knodell F4:6) sonuçları daha dikkatli yorumlamalıyız. ELF skorun farklı çalışmalarda kesim değerlerinde ciddi farklılıklar olduğunu gördük. Bu nedenle kesim değerlerindeki farklılıkları gidermek için büyük popülasyonlarda ELF testin validasyonu gerekmektedir. Bununla birlikte tek başına HA de fibrozis tanısında ilerleyen dönemlerde kendine yer bulabilir. Bu şekilde tek bir parametre kullanılması maliyet açısından önemli kazanç sağlayabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010 Apr;51(4):1438-44. PubMed PMID: 20209607. Pubmed Central PMCID: PMC2850946. Epub 2010/03/09. eng.
2. Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Molecular aspects of medicine*. 2008 Feb-Apr;29(1-2):58-66. PubMed PMID: 18022682. Epub 2007/11/21. eng.
3. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1655-69. PubMed PMID: 18471545. Pubmed Central PMCID: PMC2888539. Epub 2008/05/13. eng.
4. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Aug 1;102(3):538-49. PubMed PMID: 9691091. Pubmed Central PMCID: PMC508915. Epub 1998/08/06. eng.
5. Strassburg CP, Manns MP. Approaches to liver biopsy techniques--revisited. *Seminars in liver disease*. 2006 Nov;26(4):318-27. PubMed PMID: 17051446. Epub 2006/10/20. eng.
6. Sheela H, Seela S, Caldwell C, Boyer JL, Jain D. Liver biopsy: evolving role in the new millennium. *Journal of clinical gastroenterology*. 2005 Aug;39(7):603-10. PubMed PMID: 16000929. Epub 2005/07/08. eng.
7. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *The American journal of gastroenterology*. 2002 Oct;97(10):2614-8. PubMed PMID: 12385448. Epub 2002/10/19. eng.
8. Garcia-Tsao G, Boyer JL. Outpatient liver biopsy: how safe is it? *Annals of internal medicine*. 1993 Jan 15;118(2):150-3. PubMed PMID: 8416312. Epub 1993/01/15. eng.

9. Campbell MS, Reddy KR. Review article: the evolving role of liver biopsy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004 Aug 1;20(3):249-59. PubMed PMID: 15274661. Epub 2004/07/28. eng.
10. Bedossa P, Poynard T, Naveau S, Martin ED, Agostini H, Chaput JC. Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1988 Feb;12(1):173-8. PubMed PMID: 3279852. Epub 1988/02/01. eng.
11. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003 Dec;38(6):1449-57. PubMed PMID: 14647056. Epub 2003/12/04. eng.
12. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1994 Jul;20(1 Pt 1):15-20. PubMed PMID: 8020885. Epub 1994/07/01. eng.
13. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet (London, England)*. 2001 Apr 7;357(9262):1069-75. PubMed PMID: 11297957. Epub 2001/04/12. eng.
14. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1981 Sep-Oct;1(5):431-5. PubMed PMID: 7308988. Epub 1981/09/01. eng.
15. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 1995 Jun;22(6):696-9. PubMed PMID: 7560864. Epub 1995/06/01. eng.
16. Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, Burroughs AK, Dhillon AP. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut*. 2006 Apr;55(4):569-78. PubMed PMID: 16531536. Pubmed Central PMCID: PMC1856155. Epub 2006/03/15. eng.
17. Calvaruso V, Burroughs AK, Standish R, Manousou P, Grillo F, Leandro G, et al. Computer-assisted image analysis of liver collagen: relationship to Ishak

- scoring and hepatic venous pressure gradient. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2009 Apr;49(4):1236-44. PubMed PMID: 19133646. Epub 2009/01/13. eng.
18. Rojkind M, Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. Collagen and related research. 1982 Mar;2(2):151-75. PubMed PMID: 7049553. Epub 1982/03/01. eng.
  19. Feldmann G. Critical analysis of the methods used to morphologically quantify hepatic fibrosis. *Journal of hepatology*. 1995;22(2 Suppl):49-54. PubMed PMID: 7665850. Epub 1995/01/01. eng.
  20. Rubio CA, Porwit A. Quantitation of fibrosis in liver biopsies. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*. 1988 Apr;10(2):107-9. PubMed PMID: 3390285. Epub 1988/04/01. eng.
  21. James J, Bosch KS, Aronson DC, Houtkooper JM. Sirius red histophotometry and spectrophotometry of sections in the assessment of the collagen content of liver tissue and its application in growing rat liver. *Liver*. 1990 Feb;10(1):1-5. PubMed PMID: 2308475. Epub 1990/02/01. eng.
  22. Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut*. 2013 Sep;62(9):1234-41. PubMed PMID: 23645629. Epub 2013/05/07. eng.
  23. Bruck R, Hershkovich R, Lider O, Aeed H, Zaidel L, Matas Z, et al. Inhibition of experimentally-induced liver cirrhosis in rats by a nonpeptidic mimetic of the extracellular matrix-associated Arg-Gly-Asp epitope. *Journal of hepatology*. 1996 Jun;24(6):731-8. PubMed PMID: 8835749. Epub 1996/06/01. eng.
  24. Bruck R, Genina O, Aeed H, Alexiev R, Nagler A, Avni Y, et al. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2001 Feb;33(2):379-86. PubMed PMID: 11172339. Epub 2001/02/15. eng.
  25. Goodman ZD, Becker RL, Jr., Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2007 Apr;45(4):886-94. PubMed PMID: 17393526. Epub 2007/03/30. eng.

26. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *Journal of hepatology*. 2007 Oct;47(4):598-607. PubMed PMID: 17692984. Epub 2007/08/19. eng.
27. Bedossa P, Carrat F. Liver biopsy: the best, not the gold standard. *Journal of hepatology*. 2009 Jan;50(1):1-3. PubMed PMID: 19017551. Epub 2008/11/20. eng.
28. Siddique I, El-Naga HA, Madda JP, Memon A, Hasan F. Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2003 Apr;38(4):427-32. PubMed PMID: 12739716. Epub 2003/05/13. eng.
29. Hui AY, Liew CT, Go MY, Chim AM, Chan HL, Leung NW, et al. Quantitative assessment of fibrosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis B. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2004 Dec;24(6):611-8. PubMed PMID: 15566512. Epub 2004/11/30. eng.
30. Eriksson S, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Smedsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Experimental cell research*. 1983 Mar;144(1):223-8. PubMed PMID: 6840207. Epub 1983/03/01. eng.
31. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European journal of cell biology*. 1997 Oct;74(2):111-22. PubMed PMID: 9352216. Epub 1997/11/14. eng.
32. Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1998 Sep;13 Suppl:S33-8. PubMed PMID: 9792032. Epub 1998/10/29. eng.
33. Prakobwong S, Pinlaor S, Yongvanit P, Sithithaworn P, Pairojkul C, Hiraku Y. Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, cytokines and collagens in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury. *International journal for parasitology*. 2009 Jun;39(7):825-35. PubMed PMID: 19168069. Epub 2009/01/27. eng.
34. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, et al. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in

experimental biliary fibrosis. *The American journal of pathology*. 1998 Dec;153(6):1895-902. PubMed PMID: 9846979. Pubmed Central PMCID: PMC1866318. Epub 1998/12/10. eng.

35. Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *The American journal of pathology*. 1997 May;150(5):1647-59. PubMed PMID: 9137090. Pubmed Central PMCID: PMC1858217. Epub 1997/05/01. eng.

36. Kivirikko KI, Myllyla R. Post-translational processing of procollagens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1985;460:187-201. PubMed PMID: 3008623. Epub 1985/01/01. eng.

37. Horslev-Petersen K. Circulating extracellular matrix components as markers for connective tissue response to inflammation. A clinical and experimental study with special emphasis on serum aminoterminal type III procollagen peptide in rheumatic diseases. *Danish medical bulletin*. 1990 Aug;37(4):308-29. PubMed PMID: 2245656. Epub 1990/08/01. eng.

38. Entzian P, Huckstadt A, Kreipe H, Barth J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. Pronounced augmented concentrations in the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease*. 1990 Nov;142(5):1079-82. PubMed PMID: 2240830. Epub 1990/11/01. eng.

39. Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Lenk S, Duswald KH, Schweiberer L, et al. Increased serum concentrations of procollagen type III peptide in severely injured patients: an indicator of fibrosing activity? *Critical care medicine*. 1993 Feb;21(2):240-7. PubMed PMID: 8428476. Epub 1993/02/01. eng.

40. Zarski JP, Sturm N, Guehot J, Zafrani ES, Vaubourdolle M, Thoret S, et al. Contribution of the ELFG test in algorithms of non-invasive markers towards the diagnosis of significant fibrosis in chronic hepatitis C. *PloS one*. 2013;8(3):e59088. PubMed PMID: 23555619. Pubmed Central PMCID: PMC3605459. Epub 2013/04/05. eng.

41. Yoo EJ, Kim BK, Kim SU, Park JY, Kim do Y, Ahn SH, et al. Normal enhanced liver fibrosis (ELF) values in apparently healthy subjects undergoing a



health check-up and in living liver donors in South Korea. *Liver international* : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2013 May;33(5):706-13. PubMed PMID: 23490160. Epub 2013/03/16. eng.

42. Janciauskiene S, Wallmark A, Piitulainen E, Kohnlein T, Welte T, Sveger T. Performance of enhanced liver fibrosis plasma markers in asymptomatic individuals with ZZ alpha1-antitrypsin deficiency. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2011 Aug;23(8):716-20. PubMed PMID: 21617532. Epub 2011/05/28. eng.

43. Xie Q, Zhou X, Huang P, Wei J, Wang W, Zheng S. The performance of enhanced liver fibrosis (ELF) test for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(4):e92772. PubMed PMID: 24736610. Pubmed Central PMCID: PMC3988013. Epub 2014/04/17. eng.

44. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Newman D, et al. Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):160-7. PubMed PMID: 18992746. Epub 2008/11/11. eng.

45. Parkes J, Roderick P, Harris S, Day C, Mutimer D, Collier J, et al. Enhanced liver fibrosis test can predict clinical outcomes in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2010 Sep;59(9):1245-51. PubMed PMID: 20675693. Epub 2010/08/03. eng.

46. Mayo MJ, Parkes J, Adams-Huet B, Combes B, Mills AS, Markin RS, et al. Prediction of clinical outcomes in primary biliary cirrhosis by serum enhanced liver fibrosis assay. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008 Nov;48(5):1549-57. PubMed PMID: 18846542. Pubmed Central PMCID: PMC2597274. Epub 2008/10/11. eng.

47. Trepo E, Potthoff A, Pradat P, Bakshi R, Young B, Lagier R, et al. Role of a cirrhosis risk score for the early prediction of fibrosis progression in hepatitis C patients with minimal liver disease. *Journal of hepatology*. 2011 Jul;55(1):38-44. PubMed PMID: 21145859. Epub 2010/12/15. eng.

48. Kim BK, Kim HS, Yoo EJ, Oh EJ, Park JY, Kim do Y, et al. Risk assessment of clinical outcomes in Asian patients with chronic hepatitis B using enhanced liver fibrosis test. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014 Dec;60(6):1911-9. PubMed PMID: 25142433. Epub 2014/08/22. eng.