

TC  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL VE NEONATAL DÖNEMLERDE SIÇAN  
KARACİĞER YILDIZSI HÜCRELERİNİN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

**SAFİYE TEMEL**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. ALPASLAN GÖKÇİMEN**

**Tez No: 21**

2004-İSPARTA

TC  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL VE NEONATAL DÖNEMLERDE SIÇAN  
KARACİĞER YILDIZSI HÜCRELERİNİN  
İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

**SAFİYE TEMEL**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. ALPASLAN GÖKÇİMEN**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 641 Proje numarası  
ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 21**

**2004-İSPARTA**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve yüksek lisans tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan sayın danışmanım ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e;

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Meltem ÖZGÜNER'e;

Özellikle immunohistokimya çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anatomi Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Osman SULAK'a;

Tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış için Isparta Sağlık Yüksek Okulu'nun değerli Öğretim Elemanlarına teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Tablolar Listesi	i
Resimler Listesi	ii
Kısaltmalar	iii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Karaciğer, Safra Kesesi ve Safra Yollarının Embriyolojik Gelişimi</b>	<b>4</b>
<b>2.2. İto Hücreleriyle Bağlantılı Olarak Hepatik Sinuzoidal Yapının Gelişimi</b>	<b>5</b>
<b>2.3. İto Hücrelerinin Embriyolojik Gelişimi</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Sıçan Karaciğer Gelişiminde Hematopoietik Olmayan Karaciğer Hücrelerinin İmmunohistokimyası</b>	<b>8</b>
<b>2.5. İn Vivo ve İn Vitro Olarak İto Hücreleri İçin Belirteçler</b>	<b>9</b>
2.5.1. Gliyal Fibrilar Asidik Protein (GFAP)	9
2.5.2. Desmin ve Vimentin	10
2.5.3. $\alpha$ -Düz Kas Aktinin	14
2.5.4. Nöral Hücre Adhezyon Molekülü (N-CAM)	16
2.5.5. Sinaptofisin (SYN)	16
<b>2.6. Karaciğer Gelişimi, Farklılaşımı, Rejenerasyonunda Rol Oynayan Faktörler</b>	<b>17</b>
2.6.1. Hepatosit Growth Faktör (HGF)	17
2.6.2. Asidik Fibroblast Growth Faktör (a-FGF)	17
2.6.3. JunD	19
2.6.4. Retinol	19
2.6.5. Yıldızsı Hücre Aktivasyon Proteini (STAP)	20
2.6.6. Epimorfin	21
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Materyal</b>	<b>22</b>
3.1.1. Deney Hayvanları	22
3.1.2. Fetüslerin Elde Edilmesi	22
<b>3.2. Metod</b>	<b>22</b>

3.2.1. Histolojik Çalışmalar	22
3.2.2. İmmunohistokimyasal Çalışmalar	24
<b>3.3. Değerlendirme</b>	<b>27</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>28</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>42</b>
<b>ÖZET</b>	<b>49</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>51</b>

**TABLÖLAR LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 1.</b> İmmunohistokimya yöntemi ile hepatik ve hepatik olmayan hücrelerde vimentin, desmin ve $\alpha$ -SMA'ın belirlenmesi	<b>15</b>

**RESİMLER LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Resim 1a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 15 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>29</b>
<b>Resim 1b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 15 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>29</b>
<b>Resim 2a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>31</b>
<b>Resim 2b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>31</b>
<b>Resim 3a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>32</b>
<b>Resim 3b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>32</b>
<b>Resim 4a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>34</b>
<b>Resim 4b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>34</b>
<b>Resim 5a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>35</b>
<b>Resim 5b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti.	<b>35</b>
<b>Resim 6a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 1 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>37</b>
<b>Resim 6b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 1 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>37</b>
<b>Resim 7a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 2 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>39</b>
<b>Resim 7b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 2 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>39</b>
<b>Resim 8a:</b> aFGF için immun boyama uygulanmış 4 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>41</b>
<b>Resim 8b:</b> Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 4 günlük sıçana ait karaciğer kesiti.	<b>41</b>

**KISALTMALAR**

<b>AFGF</b>	: Asidik fibroblast growth faktör
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	: Alfa düz kas aktinin
<b>CK</b>	: Sitokeratin
<b>FSC</b>	: Yağ depolayan hücre
<b>GFAP</b>	: Gliyal fibrilar asidik protein
<b>HGF</b>	: Hepatosit growth faktör
<b>HSC</b>	: Karaciğer yıldızsı hücresi
<b>N-CAM</b>	: Nöral hücre adhezyon molekülü
<b>PSC</b>	: Perisinuzoidal yıldızsı hücre
<b>SMC</b>	: Düz kas hücresi
<b>STAP</b>	: Yıldızsı hücre aktivasyon proteini
<b>SYN</b>	: Sinaptofisin
<b>TGF-<math>\beta</math><sub>1</sub></b>	: Transforming growth faktör



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğerde 3 tip parankimal olmayan hücre vardır: Kupffer hücreleri, endotel hücreleri ve İto hücreleri (yağ depolayan hücreler, lipositler, karaciğer yıldızsı hücreleri) (1). İto hücreleri Disse aralığında yer almaktadırlar. Hepatositler ve endotel hücreleri ile yakın temas halindedirler (1, 2). Karaciğerin esas (ana) hücrelerinin %15 ini oluştururlar (3). İto hücrelerinin karaciğer dokusu dışında, pankreasta asinuslar çevresinde, akciğerde alveoller arası septumda, böbrek korteksinde tübüller arasında ve ince bağırsaklarda lamina propiyada da görüldüğü bildirilmiştir. Elektron mikroskopta, sitoplazmaları lipit damlacıkları ile dolu granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve Golgi organelleri iyi gelişmiş, sitoplazmik uzantıları olan hücreler olarak tanımlanmıştır (4, 5). Karaciğer İto hücreleri sitoplazmalarında büyük yağ damlacıkları ile karakterize olmakla beraber % 25'inden fazlası yağ damlacığı ihtiva etmez. Bu tip İto hücrelerine 'boş İto hücreleri' denir (1). A vitamini, retinil esterleri formunda karaciğer İto hücrelerinde depolanır. Bu hücreler, hücre dışı matriks yapım ve yıkımı, transforming growth faktör  $\beta_1$  (TGF-  $\beta_1$ )'in ve hepatosit growth faktör (HGF)'ün üretilmesi ve karaciğerdeki mikrovasküler düzenlemeden sorumlu hücre fonksiyonlarını yerine getirmektedirler (5- 9).

Primer kültürde İto hücreleri dinlenme formundan aktive şekle geçmektedir. Bu süreç 'aktivasyon' veya 'transformasyon' olarak isimlendirilir. Aktivasyon sırasında İto hücreleri A vitamini depolarını kaybederler, sayıları artar ve miyofibroblastların morfolojik özelliklerini kazanırlar (1). Hücre dışı matriks, sitokin reseptörleri, kontraktıl filamanlar ve metalloproteinazlar bu süreçte rol oynamaktadırlar (9, 10). İto hücreleri aktive olunca kollajen tip I ve tip III, fibronektin, laminin, tenaskin, entaktin, undulin ve proteoglikanlar gibi birçok bağ doku elemanını üretmeye başlarlar (1, 8, 11). Karaciğer fibrogenezinde de aynı değişiklikler olmaktadır. Benzer olarak, İto hücrelerinin karaciğer fibrogenezinde önemli rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (1, 12). Kronik karaciğer hastalıklarında hücre dışı matriksteki fibrotik bileşenlerin en önemli kaynağı İto hücreleridir. Karaciğer fibrozisi, hepatosellüler karsinom ve kronik hepatit gibi patolojik koşullarda İto hücrelerindeki A vitamini depolanması azalmakta, kollajen

üretimi artmaktadır (5, 13). Hücrelerin büyümesi ve İto hücrelerine özgü çoğu fonksiyonların büyük T antijeni tarafından düzenlendiği iddia edilmektedir (8). Çok nadir olsa da İto hücrelerinden köken alan tümörler gözlenmiştir (13).

Ara filamanlar tüm memeli hücrelerinde bulunur. Doku ve hücre tiplerine göre farklılaşmışlardır. Ara filamanlarda, tubulin ile aktin birleşerek 10 nm.lik filamanları, bunlar da hücre iskeletini oluşturmak üzere polimerize olurlar (1).

Genellikle epitel hücrelerinde keratinler eksprese edilir. Nöronlarda nörofilamanlar, astroglial hücrelerde gliyal filamanlar, kas hücrelerinde desmin ve mezenşimal kökenli hücrelerde çoğunlukla vimentin eksprese edilir. Bununla beraber iki yada daha fazla ara filamanın ko-ekspresyonu (örneğin; keratinler ve gliyal fibrilar asidik protein-GFAP) miyoepitelyal hücrelerde gözlenmiştir. İto hücreleri, fonksiyonel ve morfolojik olarak düz kas hücreleri, fibroblastlar ve miyofibroblastlara benzer bir yapı sergilerler (1).

Desmin, vimentin, alfa düz kas aktinin ( $\alpha$ -SMA), gliyal fibrilar asidik protein (GFAP), tübülün immunohistokimyasal olarak İto hücrelerinde tanımlanmıştır (5). Vimentin, desmin ve  $\alpha$ -SMA eksprese etmeleri esas alınarak İto hücrelerinin mezenşimal kaynaklı oldukları düşünülmektedir (7). İn vivo ve in vitro İto hücreleri, bir ara filaman olan desmine pozitif boyanma reaksiyonu verirler. Ancak desmin pozitif boyanan İto hücreleri yanında desmin negatif boyanan İto hücrelerinin de olduğu, bu hücrelerin heterojenite gösterdiği tespit edilmiştir. Desmin ile (+) boyanan İto hücreleri vimentin ile de boyanmaktadır (5, 6). Uzamış kültür sırasındaki aktivasyonunda  $\alpha$ -SMA ile de pozitif boyanma reaksiyonu verirler. Bununla beraber yeni izole edilmiş İto hücreleri  $\alpha$ -SMA'ye pozitif reaksiyon vermez ve bunların % 50'sinden biraz fazlası desmin ile immünolojik olarak tanımlanabilir(1). Karaciğerde fibrozis geliştiğinde desmin,  $\alpha$ -SMA immün reaksiyonu oldukça artmaktadır (5). Bunun yanı sıra normal sıçan karaciğer İto hücreleri  $\alpha$ -SMA taraması ile ortaya çıkarılamaz (1). İn vivo ve in vitro koşullarda İto hücrelerinin tanımlanmasında, GFAP'ın hücreye özel bir işaretleyici olarak kullanılabileceği görülmüştür. Laminin pozitif immün reaksiyon veren hücreler İto hücreleri olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle laminin de İto hücreleri için belirleyici bir işaretleyici olarak bildirilmiştir (5).

Desmin ve  $\alpha$ -SMA in vivo ve in vitro İto hücreleri için hücre tipi özgün belirteci değildir. Çünkü hepatik düz kas hücreleri ve damar miyofibroblastları desmin ve  $\alpha$ -SMA antikorları ile reaksiyona girer. Bu yüzden desmin ve  $\alpha$ -SMA İto hücreleri ile karaciğer fibroblastik hücrelerini ayırt edebilmek için yeterli bir belirteç değildir. Ancak, GFAP kültürdeki, hasarlanmış ve normal sıçan karaciğeri İto hücreleri için özgün bir belirteçtir (1).

Son yıllarda, İto hücrelerinin biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar daha çok fibrogenез, matriks azalması ve retinoid depolamasına odaklanmıştır. Ancak yapılan literatür taraması sonucunda İto hücrelerinin embriyolojik gelişim sürecine ilişkin çok az bir veri olduğu dikkatimizi çekmiştir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, biz de karaciğer yıldızsı hücrelerinin embriyolojik gelişimlerini, sahip oldukları asidik fibroblast growth faktör (aFGF) belirtecini kullanarak immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmayı amaçladık. Planlanan mevcut çalışmada prenatal ve neonatal karaciğer gelişiminde hücrenin ilk ortaya çıkışı, diğer hücresel yapılara paralel olarak gelişim evreleri, lokalizasyonu ve özellikleri tanımlanacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Embriyonik doku veya organik düzenlenmenin histogenezinde, hücre çoğalımının meydana gelmesi, epitelyal hücrelerin farklılaşması ve sonrada doku olarak polarite kazanması esas olarak zorunludur. Organik restorasyonun morfogenezi sürecinde, epitelyal-mezenşimal etkileşimin önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Bu etkileşim genellikle hücre dışı matriks, hücre yüzeyi ile ilişkili moleküller, mezenşimal faktörlerle düzenlenmektedir (14).

### 2.1. KARACİĞER, SAFRA KESESİ VE SAFRA YOLLARININ EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ:

Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları dördüncü haftanın başında, ön bağırsağın kaudal parçasından öne doğru bir çıkıntı olarak belirirler. Divertikulum hepaticum (karaciğer tomurcuğu) septum transversum'a uzanır. Septum transversum kalp taslağı ile orta bağırsak arasında uzanan splanik mezodermal bir kitledir ve diyafragma'nın sentrum tendineum'u ile bu bölgedeki mezenteriyum ventrale'yı oluşturur. Divertikulum hepaticum, mezenteriyum ventralenin iki yaprağı arasında hızla büyüyerek ikiye ayrılır. Divertikulum hepaticum'un daha büyük olan kranial parçası primordium hepaticum adını alır. Çoğalan endodermal hücreler hepatic hücre kordonlarını ve intrahepatik safra kanallarını döşeyen epiteli oluştururlar. Bu hepatic hücre kordonları, endotel döşeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak karaciğer sinuzoidlerinin taslaklarını meydana getirirler. Karaciğerin fibröz dokusu, hematopoietik dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversumdaki mezenşimden gelişirler (15).

Karaciğer hızla gelişir ve beşinci haftadan onuncu haftaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Vena umbilicalisten karaciğere akan oksijenli kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler. Başlangıçta karaciğerin sağ ve sol loblarının büyüklüğü aynı iken, kısa bir süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Altıncı haftada başlayan hematopoiesis, karaciğere parlak kırmızı bir renk verir; karaciğerin yedinci ve dokuzuncu haftalar arasındaki büyüklüğünden de bu hematopoietik aktivite sorumludur. Dokuzuncu haftaya kadar

fetüsün total ağırlığının % 10'unu karaciğer oluşturur. Onikinci haftada, karaciğer hücreleri safra yapımına başlar (15).

Divertikulum hepaticumun daha küçük olan kaudal parçası vesika biliarisi, divertikülün sapı da duktus sistikusunu oluşturur. Başlangıçta ekstrahepatik safra yolları epitel hücreleri ile tıkanmışken, bu hücrelerin dejenerasyonu ile vakuolizasyon oluşur ve kanallar açılır. Duktus hepaticus ve duktus sistikusunu duodenuma bağlayan kordon, duktus koledokusa dönüşür. Başlangıçta duodenum kavsinin ön yüzüne bağlı olan duktus koledokus, duodenumun büyümesi ve rotasyonu ile, duodenumun arka yüzüne taşınır. Onüçüncü haftadan sonra duktus koledokustan geçerek duodenuma giren safra, mekonyuma koyu yeşil rengini verir (15).

## **2.2. İTO HÜCRELERİYLE BAĞLANTILI OLARAK HEPATİK SİNÜZOİDAL YAPININ GELİŞİMİ:**

İnsanlarda, karaciğer primordiyumu, gebeliğin 4. haftasının somit ve nöral tüp periyoduna denk gelen 20 somitli embriyonda bulunmaktadır. Ön bağırsağın distal ucundaki endodermal epitelden gelişmiştir (16). İnsanlarda gebeliğin 5. haftasında, fare ve sıçanlarda gebeliğin 10. gününde, kalınlıkları 1-2 veya daha fazla hücre içeren gevşek karaciğer hücre kordonları septum transversumun mezenşimal dokusuna doğru büyümektedir. Karaciğer hücre kordonları arasında primitif sinuzoid benzeri yapılar görülmektedir. İnsanlarda gebeliğin 6-8. haftasında veya fare ve sıçanlarda 12-14. günlerde hepatic sinuzoidlerin elemental bileşenleri belirlemektedirler. Bununla birlikte perisinuzoidal kollajen fibrilleri nadiren görülmektedir. Sinuzoidleri aralıksız bir hat haline getiren endotel hücreleri ise mitotik şekillerde görülürler. Disse aralığı genelde dardır ve bu darlık endotel hücreleri, gelişmekte olan karaciğer hücreleri ve olgunlaşmamış hematopoietik hücreler arasında yakın temaslara neden olmaktadır (16, 17). Perisinuzoidal aralıkta, İto hücreleri glikojen partikülleriyle çevrili bir ya da iki yağ damlacığı ile karakterize edilmektedir. Bunların lateral sitoplazmik oluşumları sıklıkla görülmektedir. Endotel hücrelerin sitoplazmik oluşumları da zayıflayarak ince bir tabaka haline gelirler. Organsız endotel hücre tabakalarında gözenek ve pencerelere rastlanmamaktadır. Bitişik endotel hücreleri arasında hücre içi sıkı bağlantı (tight junction) ve kompleks interdijitasyonlara sık sık rastlanmaktadır. Bu nedenle gebeliğin bu aşamasında

endotel hat genelde aralıksız görünür. Bununla beraber, nadiren de olsa karaciğer hücrelerinin mikrovillusları veya İto hücrelerinin sitoplazmik oluşumları, endotel hattaki boşluklar veya gözenekler yoluyla sinuzoide doğru, bir çıkıntı meydana getirirler. Endotel hücrelerin hemen altındaki perisinuzoidal aralıkta İto hücrelerinin sitoplazmik oluşumları lateral olarak genişlerler ve endotel hattı kuvvetlendirirler (16).

Sonuç olarak, insan embriyosunun hepatik sinuzoidal endotel hattının ve 5-12 haftalık gebelikteki fetüslerin boşluksuz yani aralıksız olduğu kaydedilmiştir. Bankston ve Pino; sıçanlarda 10-16 günlük fetal sıçan karaciğerlerindeki sinuzoidlerin hücre içi birleşme (junction) sergileyen aralıksız endotel hücreleriyle çevrili olduklarını ve gebeliğin 17. gününde aralıklı endotel hücrelerin ilk olarak görünüp ondan sonra sayıca kademe kademe arttıklarını tespit etmişlerdir. Bazal membran, sıçanlarda gebeliğin 13-14. günüyle birlikte ortaya çıkmaktadır. Gebeliğin 12-14. günlerine kadar sıkı bağlantı noktalarına sahip aralıksız endotel hücrelerinin var olduğu gösterilmiştir. Gebeliğin 15. gününden başlamak üzere aralıklı/pencereli endotel hücreleri gözlenmiştir. Yapılan bütün çalışmaların ortak sonucu; yetişkin karaciğerde olduğu gibi fetal hepatik sinuzoidal duvarlarda bazal membranın gözlenmediğidir. Endotel hücrelerinin gelişimi ile ilgili olarak, gebelik esnasındaki en belirgin değişiklik erken gelişim aşamasındaki aralıksız hücrelerin, aralıklı hücrelerle yer değiştirmesidir. Bu da, farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 17. günü, insanlarda da 12. haftada gerçekleşmektedir. Fare ve sıçanlarda doğumdan sonra 4-5. günlere kadar sinuzoidal ve perisinuzoidal yapılar tamamıyla oluşurlar (16).

### **2.3. İTO HÜCRELERİNİN EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİ:**

Erken gebelik döneminde insan karaciğer hücre kordonları, septum transversumun mezenşimal dokusunu istila ederler. Septum transversumdaki mezenşimal hücreler perisinuzoidal aralığa yerleşirler ve İto hücreleri haline gelirler (16, 17). İto hücrelerinin nükleusları ovoid (yumurta) şeklindedir ve gelişmekte olan hematopoietik hücreler tarafından iyice sıkıştırılmış vaziyettedir (16). Sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulumun homojen ve elektron yoğun materyalle dolu hafif genişlemiş kısa tubuler profilleri bulunmaktadır. Aynı zamanda birkaç küçük

mitokondriyon, dađınık haldeki serbest ribozomlar ve dűzensizce seyreden mikrofilamanlar da gűrűlebilmektedir. Birkaç yođun cisim ve primer lizozom bulunmakta fakat hiçbir sekonder lizozom gűzlenmemektedir (16, 18). Fetal İto hűcrelerinin sıklıđı, yetiřkin insan karaciđerlerindekiinden daha yűksektir. Gebeliđin bu ařamasında Ito hűcrelerinin ince yapısı, yetiřkin karaciđerlerdeki fibroblastlara benzemektedir. Bunun nedeni ise, fibroblastlar ve İto hűcrelerinin her ikisinin de septum transversumdaki mezenřimal hűcrelerden kűken almasıdır. Gebeliđin farelerde 15. gűnű civarında, sıçanlarda 16-18. gűnler civarında İto hűcreleri artık elektron yođun materyalle ve iyi geliřmiř Golgi kompleksiyle dolu ve űnemli ۆlűde geniřlemiř granűllű endoplazmik retikuluma sahiptirler. Ayrıca bu hűcrelerin plazma zarı altındaki bűlgelerinde bulunan mikrofilamanlarda da hafif bir artıř gűrűlűr. Her ne kadar gebeliđin bu ařamasında İto hűcreleri, tipik miyofibroblastların içerdiklerinden daha az miktarda mikrofilaman ve plazmalemma altında yođun alanlar içermekte iseler de, bu űzelliklerinin tipik miyofibroblastların űzelliklerine benzediđi gűrűlűr. Bu durum fetal İto hűcrelerinin miyofibroblast benzeri transformasyonu olarak deđerlendirilmektedir (16).

Civciv embriyosu karaciđerinde İto hűcrelerinin geliřimi, elektron mikroskobu kullanılarak çalıřılmıřtır. Disse aralıđındaki kollajen fibriller hemen 6 gűnlűk civciv embriyonlarında gűrűlműřtir. Bu aralık, primitif İto hűcreleri olarak adlandırılan fibroblast benzeri hűcreleri içermektedir. A vitamini fluoresansı ve lipit damlacıkları, inkűbasyonun 9. gűnűnde primitif İto hűcrelerinde gűrűlmeye bařlarlar. Disse aralıđındaki primitif İto hűcreleri, A vitamini alma ve depolamadan daha űnce kollajen fibrillerini űretme yeteneđi kazanırlar (18).

Erken gebelik ařamasında İto hűcreleri, genelde glikojen partikűlleriyle çevrili olan çok az miktarda kűűk yađ damlacıkları içermektedirler. Yetiřkin insan karaciđerlerinde ise İto hűcreleri, glikojen partikűlleri ile çevrili olmayan ve daha bűyűk sayıda yađ damlacıklarına sahiptirler. Bu yűzden glikojen partikűlleriyle çevrili intrasitoplazmik yađ damlacıkları, erken gebelik ařamasındaki insan İto hűcrelerine ۆzgűdűrler (16). Gebelik esnasında İto hűcrelerindeki yađ damlacıklarının sayısı, geç fetal karaciđerlerdeki A vitamininin yođunluđundaki artıřa paralel olarak kademe kademe artmaktadır (16, 19). Bununla birlikte perinatal ařamalarda bile yađ damlacıklarının sayısı, yetiřkin karaciđerlerin İto hűcrelerindeki

yağ damlacıklarının sayısına kıyasla çok çok düşüktür (16, 18). Bu tespit, fetal ve neonatal aşamalarda, yetişkinlerdekine nazaran depolanmak üzere daha az bir miktarda A vitamini oluşunun morfolojik bir yansıması olabilir (16).

İto hücrelerinin erken gebelik dönemindeki ince yapı özellikleri açısından fibroblastlara benzedikleri, daha sonraki fetal yaşamda (farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 16-18. günler civarında) ise kısmen miyofibroblast benzeri özellikler sergiledikleri kaydedilmektedir (16).

Farelerde ve sıçanlarda doğumdan sonra 4-5. günlerde bazı farklılıklar halen varlığını sürdürmekte ise de, sinuzoid ve perisinuzoidal yapılar, endotelial hücreler ve İto hücreleri morfolojik olarak yetişkin aşamadakilere çok benzemektedirler (16).

#### **2.4. SIÇAN KARACİĞER GELİŞİMİNDE HEMATOPOİETİK OLMAYAN KARACİĞER HÜCRELERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASI:**

Hücrelerin şekillerine ve lokalizasyonlarına göre ayrımı kesin bir şekilde mümkün olmamaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için bir dizi moleküler belirtecin belirli bir hücre tipini tanımlamak amacıyla karşılaştırılması gerekmektedir (20).

Normal yetişkin, neonatal ve fetal sıçan karaciğerinde, desmin, alfa düz kas aktinin ( $\alpha$ -SMA) sitokeratin no.8 (CK.8) ve no.18 (CK.18)' in ekspresyonu ve hücreler dağılımı kriyostat kesitlerde immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Gebeliğin 14. ve 15. günlerinde embriyonik karaciğerdeki hemapoietik olmayan hücreler güçlü desmin pozitifdir. Başlıca periferde lokalize olan hücrelerin bazıları anti-  $\alpha$ -SMA ile de boyanmışlardır. Desmin immünoreaktivitesi gebeliğin 16. gününden sonra gittikçe azalmaktadır. Desmin pozitif hücrelerin fetal ve erken neonatal gelişim sırasında hematopoietik hücreler ile yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. 16. gününden sonra ilkel hepatositler desmin negatif hale gelir. Geriye CK-8 ve CK-18 pozitivitesi kalır. Desmin eksprese eden hücrelerin sayısı karaciğerde, embriyonik periyoddan neonatal döneme geçtiğinde artmıştır. Bununla beraber her birim alandaki mutlak sayıları, hepatositlerle ilişkili olarak yaş ile azalmaktadır (21).



## 2.5. İN VIVO VE İN VİTRO OLARAK İTO HÜCRELERİ İÇİN BELİRTEÇLER:

### 2.5.1. Gliyal Fibrilar Asidik Protein (GFAP):

Gliyal fibrilar asidik protein (GFAP), 50 kDa büyüklüğünde bir ara filamandır ve bunlar ilk olarak merkezi sinir sistemindeki astrogliyal hücrelerde tanımlanmışlardır. Beyin travması, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalık durumlarında GFAP ekspresyonunun birkaç kat arttığı gözlenmiştir. Astrogliyal hücrelerden başka, GFAP immünoaktivitesi, olfaktör sistemin Schwann hücrelerinde gösterilmiştir. Periferal sinir sisteminde olduğu gibi birçok özel bölgede bulunur. Sıçan enterik gliya benzeri hücrelerinde tespit edilmiştir. Sinir sistemi haricinde GFAP immünoaktivitesi tükrük bezlerinde, lens epitelinde ve karaciğerde lokalize olabilir. Gard ve Ark. ları karaciğer perisinuzoidal hücrelerinde mevcut olan GFAP immünoaktivitesini dolaylı olarak immunofloresans ile göstermişlerdir (1).

Normal ve hasarlı sıçan karaciğerinde GFAP'ın immünoaktivitesi incelenmiş; İto hücrelerindeki GFAP gen ekspresyonu, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve hepatositlerde de analiz edilmiştir (1). Normal karaciğerde perisinuzoidal alanda GFAP (+) hücreler bulunmuştur (1, 6). Bu hücrelerin aynı zamanda desmin (+) olduğu immün boyama ile belirlenmiştir. Damar duvarlarının hücreleri ise desmin (+), GFAP (-) tir. Tüm GFAP (+) hücreler, desmin (+) tir. Fakat bazı desmin (+) hücreler, gliyal fibrilar asidik protein (-) tir (özellikle septanın içinde). İn vitro olarak test edilmiş farklı karaciğer hücre alt grupları arasında, GFAP gen ekspresyonu sadece İto hücrelerinde saptanabilmiştir. Primer kültürde GFAP ekspresyonunun, İto hücre aktivasyonuna paralel olarak azaldığı görülmüştür (1, 22).

GFAP, İto hücreleri ile diğer fibroblastik karaciğer hücrelerinin (damar duvarlarının hücreleri) ayırt edilmesini sağlayan İto hücrelerinin yeni hücre tipi özgün belirleyicisidir. Bunlar İto hücrelerini temsil etmek üzere fibrotik septaların kenarlarına lokalize olmuşlardır (1, 23).

Perisinuzoidal Stellat hücre (PSC)'nin miyofibroblasta dönüşümü esnasında hücre içindeki GFAP miktarı artmaktadır. Bu dönüşüm süreci, hücre iskeletine ait işaretlenmiş değişiklikler ile tanımlanabilmektedir. GFAP eksprese edilmesine bağlı

olarak, İto hücrelerinin normal ve dönüşmüş fenotipleri arasında ayırım yapmak mümkündür (20).

İto hücre aktivasyonunun yüksek bir kasılma kapasitesi ile sonuçlandığı kabul edilmektedir. Aktivasyon sırasında, erken kültürlerde bulunan İto hücreleri çoğalmakta ve transisyonel hücreler vasıtasıyla fenotipik olarak miyofibroblastlara dönüşmektedirler. Transisyonel hücreler, İto hücreleri ve miyofibroblastların arasında ara özellikler taşıyan hücrelerdir ve İto hücrelerine kıyasla sitoplazmada daha düşük sayıda lipit damlacığına sahip olmalarıyla ve endoplazmik retikulumun belirgin bir şekilde görünmesiyle karakterize edilmektedirler. Miyofibroblastlar ise, fibroblastlarla düz kas hücreleri arasında bir ara hücre tipi sayılmaktadırlar. Bazı karakteristik kollajen tiplerini yüksek oranda eksprese etmeleri, desmin ve mezenşimal bir belirteç olan vimentin gibi belirli ara filaman proteinlerini artan oranlarda eksprese etmeleri ve A vitamininden yoksun olmaları miyofibroblastları normal perisinuzoidal hücreden ayıran özelliklerdir (20).

GFAP; şimdiye kadar perisinuzoidal İto hücrelerinin hem normal hem de dönüşüme uğramış fenotiplerinde var olduğu bilinen en genel İto hücre belirleyicisidir (20).

### **2.5.2. Desmin Ve Vimentin:**

Fetal sıçan karaciğerinde desminin immünlökizasyonu, gebeliğin 12. gününden itibaren çok sayıda karaciğer hücresinde gösterilmiştir. Yaklaşık gebeliğin 20. gününde yetişkin sıçan karaciğerindekiler ile aynı yoğunlukta desmin içeren hücreler bulunmuştur. Özellikle gebeliğin 12-13. günlerinde desmin içeren 2 çeşit karaciğer hücresi gösterilmiştir:

- a) Hücrenin her yerinde basket potası şeklinde ağ oluşturan ara filamanları ile hepatositler,
- b) Bitişik hücreler arasında yer alan ince-uzun oluşumları ve daha kuvvetli boyanmış ara filamanları ile İto hücreleri.

Desmin pozitivitesi yönünden, gebeliğin 14. gününden sonra hepatositler azalır ve 18. günden sonra sadece İto hücreleri kalır (24). Hepatositler sitokeratin ve desmin, İto hücreleri ise vimentin ve desmin içerir (24, 25).

Sıçanlarda fetal İto hücreleri ve hepatositlerin gebeliğin 12 ve 13. günlerinde bazı ortak özellikleri vardır:

- a) Az yada çok yıldızimsı şekillidirler.
- b) Yağ damlacıkları ve muhtemelen A vitamini içerirler (24).
- c) İto hücrelerinde bulunan desmin aynı zamanda sitokeratin C8 ve C18'i içeren fetal hepatositlerde de vardır (24, 25).

İto hücreleri normal yetişkin karaciğerde hepatosit growth faktörü (HGF) eksprese etmektedirler ve bu şekilde parakrin yolla hepatosit artışını düzenliyor olabilirler. Gelişen karaciğer dokusunda desmin pozitif fetal İto hücrelerinin yüksek yoğunluğu, etraftaki hepatositlerin çoğalmı için gerekli olmasındandır. Bu hücreler, aynı zamanda hücre farklılaşmasında çok önemli yeri olan hücre dışı matriksi ürettiklerinden, hepatosit olgunlaşmasını kontrol etmektedirler (24).

Hepatik sinuzoidi çevreleyen hücreler, yetişkin dişi sıçanlarda (12 aylık) izole edilmişlerdir ve İto hücrelerinin (yağ depolayan hücreler) özelliklerini belirlemek üzere uygun bir şekilde kültüre edilmişlerdir. İto hücrelerinin izolasyonunda bir belirteç olarak desmin boyaması kullanılmıştır ve yüksek derecede pürifiye desmin pozitif hücre fraksiyonu elde edilmiştir. Desmin pozitif hücrelerin %10'undan daha azı, A vitamini oto-fluoresansı için de pozitif bulunmuştur. Bununla beraber, A vitamini pozitif hücrelerin sayısı, vitamin A verildikten sonra artmış ve A vitamini verildikten 1 hafta sonra desmin pozitif hücrelerin sayısı % 50 oranında çoğalmıştır. Kültüre edilmiş İto hücreleri desmin ve vimentin boyamalarının her ikisi için de pozitifdir. İto hücrelerinin alt kültürlerinin tekrarlanmasından sonra yağ damlacıkları kaybolmuştur. İto hücrelerinin elektron mikroskopik özellikleri, kalın gövdelerinin yokluğu ile ayırt edilen miyofibroblastlara benzer hale gelmiştir. Bu da İto hücrelerinin olasılıkla miyofibroblastlara dönüşebildiğini göstermektedir. Kollajen lifler bazen, hücre dışı aralıkta rastlanmıştır. Bu sonuçlar, İto hücrelerinin miyojenik ve fibrojenik özelliklerinin her ikisini de taşıdığını ve liposit veya miyofibroblastların özgün fonksiyonlarını koruyan desmin pozitif hücreler olduklarını göstermiştir. Ara filamanların boyanması İto hücrelerin tanımlanmasında yararlıdır ve yüksek derecede izole edilen İto hücre fraksiyonunun belirteç olarak desmin boyası kullanılarak gösterilmesi kolaylaşabilir (26).

Desmin ve vimentin ara filamanlarının, perisitlerdeki kompozisyonu tavuk mikrovasküler yataklarının dondurulmuş kesitlerinde immunofluoresans ve immunoelektron mikroskopik işaretleme ile çalışılmıştır. İncelenen tüm perisitler, desmin ve vimentinin her ikisini de içermektedir ve bunların kompozisyonu, vasküler düz kas hücrelerinde bulunanlar ile aynıdır. İlâveten desmin ve vimentin, hepatik sinuzoidin İto hücrelerinde (bunlar karaciğer özel perisitleridirler) ve splenik sinuzoidin retiküler hücrelerinde bulunmuştur. Bu hücreler perisitlerin olmadığı kapillerlerde endotel hücrelerinin dışında bulunurlar. Desmin varlığı perisitlerin ve İto hücrelerinin de, damar düz kas hücreleri gibi kontraktıl cisimler içerdiği hipotezini desteklemektedir. Perisitlerin olmadığı mikrovasküler yataklarda desmin ve vimentinin endotel hücrelerine bitişik yer aldığını ve perisitlere benzer fonksiyonlar gösterdiğini ortaya koyulmuştur. Perisitlerin fonksiyonlarının şu şekilde olduğu tahmin edilmektedir:

- (a) Kurbağa gözlerinin kapillerleri etrafında bulunan Rouget hücrelerinde in vivo incelenmiş olarak; kontraktilite .

Diğer yandan kuşlara ve memeli hayvanlara ait perisitlerde çok anlamlı olmamakla birlikte şunlar ispatlanmıştır:

- (b) Fagositoz: İnflamatuar reaksiyonlarda perisitlerde yabancı materyallerin arttığı gözlenmiştir.
- (c) Mezenşimal farklılaşma: Perisitlerin düz kas hücre fibroblastları ve yetişkin hayvanlardaki diğer mezenşimal hücrelere farklılaştıklarına inanılmaktadır. Plazma hücrelerine farklılaştıkları bile bazı yazarlar tarafından kabul edilmektedir. Perisitler için spesifik markerlerin olmayışından dolayı bu yetenekleri gösterilememektedir (27).

Hepatik sinuzoiddeki lümen, endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri ile sınırlanmıştır. Sinuzoidi çevreleyen hücreler ve hepatik parankimal hücreler arasında Disse aralığı olarak adlandırılan perivasküler aralık mevcuttur. Hepatositlerin çok sayıdaki mikrovillusları boyunca, İto hücrelerinin uzantıları, aralıktaki sinuzoidal duvara paralel olarak gözlenmişlerdir. Lokalizasyonları göz önünde tutulursa, bunların İto hücrelerinin gövde ve uzantıları olması olasıdır. İmmunofluoresans mikroskobu ile her iki protein için işaretleme, hücre gövde ve uzantılarındaki yoğunluk bakımından karşılaştırılabilmektedir. Dolaylı olarak

immunoelektron mikroskobu, desmin veya vimentinin biri ile işaretlenmiş Disse aralığındaki endotel hücreleri ve hepatik parankimal hücreler arasında lokalize olmuş hücre uzantılarını açık bir şekilde göstermektedir. Bu da her iki proteinin de İto hücrelerinde bulunduğu sonucunu doğrulamaktadır (27).

Desmin varlığı nedeniyle İto hücreleri de, perisitler ve damar düz kas hücreleri gibi kasılma yeteneğine sahiptirler. Endotelin-1 (ET-1) ve substance P.' ye karşı, kültüre edilmiş İto hücrelerinin kasılabilme yanıtları incelenmiştir. İto hücrelerinin alanı kültür ortamında ve 4 değişik konsantrasyonlarda endotelin-1 ve substans P ile işlemiden sonra ölçülmüştür. Hücrelerin alanı, doza bağlı olarak, endotelin-1 ve substans P ile işlemiden sonra azalmıştır. 200nm/L endotelin-1 ile işlemiden sonra alandaki maksimal azalma muameleden sonraki 60. dakikada meydana gelmektedir. 200nm/L substans P için alandaki maksimal azalma 10. dk.da dikkat çekmektedir. İto hücreleri, endotelin-1 ve substans P'ye yanıt olarak kasılmışlardır. Uzantıların durumu ve kontraksiyonun başlangıcı her iki peptid için farklıdır. Bu bulgular, İto hücrelerinin hepatik sinuzoidal mikrosirkülasyonun düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (28).

Sinuzoid içinde perisinuzoidal alanda bulunan İto hücreleri, sinuzoidal kasılmayı en iyi şekilde gerçekleştirmektedir. Son on yılda yapılan çalışmalarda, perisinuzoidal İto hücrelerinin karaciğer hasarlanması ve İto hücre aktivasyonundan sonra çok önemli bir özelliği olan hücresel kasılma için dikkati çeken bir kapasite sergilediği gösterilmiştir. İn vivo mikroskopi çalışmaları sinuzoidal kasılmaya aracılık eden İto hücrelerini açığa çıkarmıştır (29).

Endotelin-1 ile yapılan bir başka İto hücre deneyinde karaciğer İto hücrelerinin, sinuzoidal akışın düzenlenmesine katıldıkları öne sürülmüştür. Normal sıçan karaciğerinde istirahatte olan Hepatik Stellat Hücre (HSC), ET-1 verildikten sonra sinuzoidal kan akımının düzenlenmesine karışmamıştır (30).

Dinlenmede ve değişime uğramış karaciğer İto hücrelerinde desmin içeren ara filamanların formasyonu için gerekli şartlar araştırılırken GFAP ve vimentin yokluğunda desminin ara filamanlarının tam uzunlukta demetler oluşturamadıkları gösterilmiştir. Dinlenmede ve değişime uğramış GFAP (-/-), vimentin (-/-) İto hücreleri normal ara filaman demetlerinden yoksundurlar. Tek başına vimentinin yokluğu perinükleer bölgede desmin içeren ara filaman demetlerinin oluşumunu

kısıtlamaktadır. Tek başına GFAP'ın yokluğu desmin içeren ara filamanların formasyonuna müdahale etmemektedir. Böylece İto hücrelerindeki normal ara filaman oluşumu için, desmini vimentin ile eşleştirmek gerekmektedir (31).

### **2.5.3. $\alpha$ -Düz Kas Aktinin:**

Normal ve hastalıklı insan karaciğeri İto hücrelerinde sinuzoid ve perisinuzoidal yapının gelişimi ile bağlantılı olarak alfa düz kas aktinin ( $\alpha$ -SMA) immunoreaktivitesi araştırılmıştır. Gebeliğin 6-7. haftalarında, İto hücreleri  $\alpha$ -SMA için tamamen negatiftir ve sinuzoidal yapının oluşumu da yetersizdir. Yaklaşık olarak gebeliğin 6. ayından sonra, nadiren de olsa  $\alpha$ -SMA pozitif İto hücreleri gözlenmeye başlanmıştır. 9 aylık gebeliklerde bazen kuvvetli bir İto hücre  $\alpha$ -SMA pozitivitesi gösterilmiştir. Doğumdan sonraki 4 yıl içinde,  $\alpha$ -SMA için İto hücreleri kuvvetli bir reaktivite göstermiştir ve sinuzoid yapısı yetişkinlerdekiyle hemen hemen aynıdır. Elektron mikroskobu ile İto hücrelerinin miyofibroblastik transformasyonunu tespit edilmiştir. Bu aşamada hepatik eritropoiezis hemen hemen durmuştur. Buradan da İto hücrelerinin miyofibroblastik transformasyonunun organogenezis ile birlikte meydana geldiği sonucuna varılmıştır (32).

Normal ve patolojik yetişkin insan karaciğerlerinde, İto hücrelerini tanımlamak için,  $\alpha$ -SMA , desmin ve vimentin monoklonal antikorları kullanarak avidin-biotin-peroksidaz kompleks metodu ile immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. Normal yetişkin karaciğerinde ince sitoplazmik oluşumları olan perisinuzoidal hücreler yanında vasküler düz kas hücreleri (SMC) ve perisitler de  $\alpha$ -SMA için pozitifler (Tablo 1). Perisinuzoidal hücreler, sinuzoidal duvar boyunca dağınık ve ayrı ayrı tabakalar oluşturmuşlardır. İmmunoelektron mikroskobu,  $\alpha$ -SMA pozitif perisinuzoidal hücrelerin, yağ damlacıkları içeren İto hücreleri olduklarını göstermiştir (6, 33, 34).

**Tablo 1.** İmmunohistokimya yöntemi ile hepatik ve hepatik olmayan hücrelerde vimentin, desmin ve  $\alpha$ -SMA'nin belirlenmesi (34).

HÜCRELER	Vimentin	Desmin	$\alpha$ -SMA
FSCs	+	+	+
SMCs	+	-	+
Fibroblast	+	-	-
Kc	+	-	-
Hepatosit	-	-	-

Yeni izole edilmiş İto hücrelerinin kültürde geçen süre zarfında desmin ve  $\alpha$ -SMA ekspresyonu artmıştır. İzolasyondan sonraki 7. günde kültürde bulunan bütün hücreler güçlü bir şekilde vimentin, desmin ve  $\alpha$ -SMA pozitifler. Daha uzun süre kültürde korunan Ito hücreleri, yağ damlacıklarını kaybetmekte fakat desmin ve  $\alpha$ -SMA pozitif olarak kalmaktadırlar. In vitro ve olasılıkla in vivo aktif hale gelmiş karaciğer yıldız hücrelerdeki  $\alpha$ -SMA gen ekspresyonunda meydana gelen artış, hücre proliferasyonu ile ilgili görünmektedir.  $\alpha$ -SMA, bölünen yağ depolayan hücre (FSC)'lere işaret eden yeni bir gösterge olabilir.  $\alpha$ -SMA gen ekspresyonunun, in vitro hücre proliferasyonu esnasında artmış olması FSC'nin düz kas hücrelerinden ayırt edilmesini sağlayacaktır (34).

Kronik karaciğer hastalığında  $\alpha$ -SMA pozitif İto hücreleri, sayı, büyüklük ve özellikle nekroz alanlarında immün boyanma yoğunluğunda artma göstermişlerdir. Kesintisiz bir hücresel ağ formu yaparlar. Bu hücreler, düzensiz uzamış sitoplazmik oluşumlar, mikrofilaman miktarının artması ve karakteristik yağ damlacıklarının kaybı ile beraber, şekil olarak dentritikleşmişlerdir. Böylece bunların ince yapı özellikleri miyofibroblastik hücreler ile uyumludur (33, 35).

Bu sonuçlar göstermiştir ki; anti-  $\alpha$ -SMA antikoru kullanılan immünohistokimya, yetişkin insan karaciğerinde normal ve dönüşmüş İto hücrelerinin tanımlanması için güvenli ve duyarlı bir methoddur (33, 35). Bu aktin izoformları ile sıklıkla embriyonik periyoddan adölesan periyoda kadar PSC'lerde karşılaşılır (36).

#### **2.5.4. Nöral Hücre Adhezyon Molekülü (N-CAM):**

Yıldızsı hücrelerde nöral hücre adhezyon molekülü de bulunmaktadır. Normal insan karaciğerinde periportal alanlarda baskındır. Normal sıçan karaciğerinde, çok az N-CAM varlığı bulunabilir, fakat fibrotik karaciğerde tanımlanmış N-CAM ekspresyonu, miyofibroblast benzeri hücre gruplarında belirlenmiştir (37- 39).

Yıldızsı hücelere karaciğer özel perisitleri de denmektedir. Çünkü bunlar astroglial (GFAP), miyojenik (desmin) ve nöral (N-CAM) kökenli hücre işaretleyicilerine sahip olmaları ile diğer organlardaki perisitler ile çarpıcı benzerlikler gösterirler (39, 40).

#### **2.5.5. Sinaptofisin (SYN):**

Sinaptofisin (SYN); küçük (30-80 nm) elektron yarı şeffaf veziküllerin başlıca transmembran glikoproteinidir. Bu protein, ekzositoz ve nörotransmitter uyarılmanın kontrol edilmesinde (örneğin: nöromusküler sinapsta) yer almaktadır. Bilindiği gibi yalnızca nöral ve nöroendokrin hücre tipleri, SYN eksprese etmektedirler. SYN, insan yıldızsı hücrelerinde ve sinir yığınlarında immunoreaktiftir (7).

SYN reaktivitesi hem insan hem de sıçan normal karaciğer biyopsilerinde dinlenmede ve aktif hale gelmiş perisinuzoidal yıldızsı hücrelerde mevcuttur. SYN reaktif perisinuzoidal hücrelerin sayısı patolojik durumlarda artmaktadır. Alfa düz kas aktinin ve SYN için çifte boyama, konfokal lazer tarama mikroskobu ile incelenmiş ve lobular yıldızsı hücrelerde her iki belirtecin kolokalizasyonu (beraberce) açık bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca, yeni izole edilmiş sıçan İto hücreleri SYN mRNA ve proteinini eksprese etmişlerdir. Elektron mikroskobu, küçük elektron yarı şeffaf vezikülleri nöronlardaki SYN reaktif sinaptik kabarcıklarla karşılaştırılabilir şekilde ortaya koymuştur. Bu durum, karaciğer İto hücrelerinin parakrin olarak adrenerjik uyarım yoluyla hepatositlerdeki glikojenolizisi modüle etmesini; sinuzoidal mikrosirkülasyonu etkilemesini ve merkezi sinir sisteminin kontrolü altında endokrin ve parakrin maddeleri (örneğin: endotelinler ve nitrik oksit) kontrol etmesini açıklamaktadır. Tüm bu delillere dayanarak SYN'nin aktive olmuş karaciğer İto hücreleri kadar, istirahatte olan İto hücreleri için de yeni bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır (7).



## **2.6. KARACİĞER GELİŞİMİ, FARKLILAŞIMI VE REJENERASYONUNDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER:**

### **2.6.1. Hepatosit Growth Faktör (HGF):**

Hepatosit growth faktör, in vitro olgun hepatositler için kuvvetli bir uyarandır. HGF reseptörü, proto-onkogen c-met'in ürünüdür (41).

Deneysel sistemde yetişkin, pre ve postnatal karaciğerde oval hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını indüklemek için asetilaminofloren verilmiş sıçanlara kısmi hepatektomi yapılmıştır. HGF transkriptleri, kısmi hepatektomiden sonraki ilk gün artmakta, 6. günde pik yapmakta, 13. güne kadar seviyesini korumakta, 20. günde ise normal seviyesine ulaşmaktadır. C-met ekspresyonu da oval hücre proliferasyonuna paralel olarak kademeli olarak artmakta, 9-13. günler civarında pik yapmaktadır (41).

Gelişmekte olan karaciğerde, HGF seviyesinin artması, doğumdan sonraki 4-21. günler arasında olmuştur. Doğumdan sonra 1. haftada pik yapan c-met ekspresyonu da aynı zamanda biraz artmıştır (41).

C-met transkriptleri oval hücre tarafından etkin bir şekilde eksprese edilirken; HGF transkriptleri İto hücrelerinde lokalizedir ve İto hücreleri ile hepatositlerin öncüsü olan oval hücreler eş zamanlı olarak çoğalmaktadırlar. Ayrıca bu hücreler büyüme ve farklılaşma esnasında karşılıklı etkileşim içersindedirler (41).

HGF transkriptlerinin tüm İto hücrelerinde bulunmaması, İto hücrelerinin sadece farklılaşmanın bazı aşamalarında, HGF transkriptlerini eksprese edebilmesinden dolayıdır. İto hücreleri, miyofibroblast ve fibroblasta dönüştüğünde HGF üretim yeteneğini kaybederler (41).

Hepatik farklılaşma ve karaciğer gelişiminde HGF, TGF- $\alpha$  ve aFGF'ü içeren birçok sitokin ekspresyonu üst üste olmaktadır. Growth faktörler arasında, HGF parakrin yolla işlev yaparken, TGF- $\alpha$  ve aFGF otokrin ve parakrin mekanizmaların her ikisi ile de işlev yapar (41).

### **2.6.2. Asidik Fibroblast Growth Faktör (a-FGF) :**

Asidik fibroblast growth faktör (a-FGF), heparin sülfat proteoglikanlarına yüksek afinite gösteren growth faktörler ailesindedir. Bazik ve asidik FGF'nin her ikisi de erken embriyonik gelişimde önemli rol oynar ve hücre sel değişim, göç ve

anjyogenezdeki bazı hücreler için de uyarandır. Matrikse bağlı heparin sülfat proteoglikanları, FGF'ler için yüksek kapasiteli reseptörlerdir. FGF'ler proteoglikanlarından heparinaz, heparatinaz veya yüksek tuz konsantresi ile salgılatılabilir. Yüksek afiniteli reseptörlere FGF'lerin bağlanması birçok hücrede (hepatositleri de kapsayan) biyolojik cevaba neden olur (42).

aFGF ekspresyon düzeyi ve hücreyel dağılımı, kısmi hepatektomi yapılan yetişkin sıçan karaciğerinde ve fetal, neonatal, yetişkin karaciğerde hepatik farklılaşma esnasında Northern analizi ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak çalışılmıştır (42).

aFGF transkripsiyonu normal dinlenen karaciğer hücrelerinde düşük seviyededir, fakat kısmi hepatektomi sonrası bariz bir artış olur (42).

Postnatal karaciğerde çok açık bir şekilde 2 veya 3 hücre kalınlığındaki hepatik kordonların normal hepatik yapıya geçişinde aFGF ekspresyonunun yüksek bir seviyede gerçekleştiği gösterilmiştir. Farklı olarak prenatal period sırasında karaciğer hala hemopoietik bir organdır, çok az sayıda sinuzoid mevcuttur ve düşük seviyede aFGF transkriptleri bulunabilirler (42).

Asidik fibroblast growth faktör ve bunun reseptör sistemlerinin karaciğer rejenerasyonu, hepatik farklılaşma ve ontogenez sırasındaki rollerini tanımlamak için Northern blot analizi ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak FGF reseptör 1 (flg) ve FGF reseptör 2 (bek) nin ekspresyonu ve hücreyel lokalizasyonu araştırılmıştır. Normal yetişkin karaciğerinde düşük seviyede bek reseptörü bulunurken, flg reseptörü yoktur. Kısmi hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu sırasında flg reseptörü az bir artış gösterirken, bek reseptörü için transkriptler önemli derecede artmıştır. Flg ve bek her ikisi de gelişen karaciğerde yüksek seviyede eksprese edilmektedir. Flg, embriyonik karaciğerde yüksek seviyede eksprese edilmiştir ve ayrıca doğumdan sonra da artmıştır. Oysa, bek'in en önemli artışı, karaciğer gelişiminin postnatal aşamasında gerçekleşmektedir (43).

Deneyler yetişkin karaciğerinde hepatik farklılaşma sırasında olduğu gibi yenidoğan hayvanlarda hepatik morfogenezin geç aşamalarında da aFGF ekspresyonunun en yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir (42).

### 2.6.3. JunD:

Bazal ve sitokinez / growth faktörlerin gösterilmesinden sonra, bu genlerin transkripsiyonunun, metalloproteinaz-1 ve interlökin-6 protein dimerleri ile bunların bağlayıcı bölgelerinin etkileşimine bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Western blot ve EMSA çalışmaları, kültürde aktive olmuş karaciğer yıldızsı hücresinin predominant Jun ailesi proteinlerini eksprese ettiğini kanıtlamıştır. Bunlardan JunD, aktive olmuş karaciğer yıldızsı hücrelerinde metalloproteinaz-1 ve interlökin-6 genlerinin doku inhibitörlerinin transkripsiyonunu düzenler (3).

### 2.6.4. Retinol:

Hepatik sinuzoidal yağ depolayan İto hücreleri, hepatik vitamin A için primer depo bölgesini temsil ederler. İn vivo olarak İto hücresi vitamin A kaybını uyarabildiği gibi, in vitro olarak da İto hücreleri primer kültür esnasında vitamin A lipit damlacıklarını spontan olarak kaybederler. İto hücre çoğalımı, in vitro olarak vitamin A içeriği ve ekstrasellüler kollajen matrikse göre değerlendirilmiştir. Hücreler, Disse aralığında mevcut olduğu varsayılan kollajen tiplerini uyararak için tip I veya tip IV kollajen matriksinde yetiştirilmiştir. Başlangıçta yeni izole edilmiş İto hücrelerinin, vitamin A lipit damlacıklarının azalmasıyla aynı anda, izolasyondan sonraki bir kaç günde çoğalmaya başladığı ve hücre retinol palmitat'da azalma olduğu gözlenmiştir. İto hücreleri, in vitro olarak arttırılmış konsantrasyonda retinole maruz bırakılmıştır. Retinol in vitro İto hücre çoğalımının niteliğini değiştirmiş ve İto hücre davranışı ile ilgili önemli bir kontrol faktörü olduğunu ortaya koymuştur (44).

İto hücrelerinde in vitro kültürden birkaç gün sonra büyük miktarda vitamin A deposu spontan olarak kaybolmuştur. Kültüre edilmiş İto hücrelerinin vitamin A'nın toksik olmayan seviyesine maruz bırakıldığında ise retinol İto hücre çoğalımında çok etkin inhibitör etki göstermiştir (44).

Çeşitli hücre tiplerini içeren çok sayıdaki vitamin A çalışması, retinoidlerin hücre farklılaşmasında önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, in vivo İto hücresi A vitamininin kaybıyla, İto hücre tavrının değişmesi beklenebilir (44).

Normalde, karaciğer yıldızsı hücreleri retinoidleri depolar, fakat bunlar karaciğer yaralanmasını takiben retinoid depolarının kaybı ile miyofibroblast benzeri hücrelere

farklılaşırlar. Leptin ekspresyonu ise, yeni izole edilmiş dinlenmede olan yıldız hücrelerde bulunamamıştır (45). Ayrıca fisetin, quersetin, apigenin, floretin, hesperetin ve kalkon flavonoidleri in vitro hepatik yıldız hücre çoğalmasını inhibe ederler (46).

### **2.6.5. Yıldız Hücre Aktivasyon Proteini (STAP):**

Yıldız hücre aktivasyon proteini (STAP), moleküler ağırlığı 21,496 kDa olan bir sitoplazmik proteindir ve miyoglobin ile amino asit sırası % 40 oranında homologdur. Bir karaciğer özgün perisiti olan sıçan yıldız hücresinin aktivasyonunun moleküler analizinde proteom kullanımı, STAP (stellate cell activation-associated protein) olarak adlandırılan yeni bir proteinin keşfedilmesini sağlamıştır (47).

STAP, fibrotik karaciğerden izole edilmiş in vivo aktive yıldız hücreleri ve primer kültür esnasında in vitro aktivasyona uğrayan yıldız hücreleri indüklemiştir. Bu indüksiyon,  $\alpha$ -düz kas aktinin, platelet-derived growth faktör reseptör- $\beta$  ve nöral hücre adhezyon molekülü gibi diğer aktivasyon sağlayan moleküller ile beraber görülmektedir. STAP'ın protein ve mRNA ekspresyonu, thioasetamid ile indüklenmiş fibrotik karaciğerde zamana bağlı olarak artmıştır. İmmunoelektron mikroskop ve proteom analizi yıldız hücrelerdeki STAP'ı belirlemiştir, fakat diğer ana hepatik hücrelerde belirlenememiştir. Rekombinant sıçan STAP'ı biyokimyasal olarak incelenmiş, hidrojen peroksit ve linoleik asit hidroperoksit yönünden peroksidaz aktiviteli bir heme protein olduğu ortaya çıkarılmıştır. Böylece STAP'ın yıldız hücre aktivasyonunu tetikleyen hidrojen peroksit ve lipid hidro peroksitleri katabolize eden yeni bir endojen peroksidaz olduğu sonucuna varılmıştır. STAP, burada karaciğerde peroksitlerin antifibrotik maddesi olarak rol oynayabilir (47).

Bu protein, in vivo ve in vitro aktive yıldız hücrelerde görüldüğünden STAP ismi verilmiştir (Stellate Cell Activation Associated Protein). STAP ve geninin ekspresyonu thioasetamid (TAA) uygulanmasıyla oluşturulan fibrotik karaciğer dokularında fazla miktarda artmıştır ve bu karaciğer fibrozisi gelişiminde STAP'ın önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir (47).

### **2.6.6. Epimorfin:**

Epimorfin, ilk olarak Hirai tarafından embriyonik deri ve akciğerde doğrudan hücre teması ile gelişen, 150 kd ağırlığında, morfogenezin mezenşimal hücre yüzey proteini olarak tanımlanmıştır. Bu proteinin fetal organların morfogenezinde kilit rolü oynadığı rapor edilmiştir (14).

Yetişkin fare karaciğerindeki hepatik sinuzoidal İto hücrelerinde, desmin ile immunohistokimyasal çift boyama tekniği kullanılarak epimorfin belirlenmiştir. Buradan yola çıkılarak, A vitamini metabolizması, karaciğer yaralanmasından sonraki fibrogenez ve sinuzoidal kan akışının düzenlenmesi gibi fonksiyonları olan bu hücrenin patolojik şartlarda karaciğer rejenerasyonunun morfogenezinde de önemli bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır (14).

Kısmi hepatektomiden (%70) sonra, fare karaciğeri immunohistokimya için 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınmıştır. Epimorfin mRNA'sı 3. günde bulunmuş ve 7. günde pik yapmıştır. Bu nedenle, epimorfin karaciğer rejenerasyonunda eksprese edilmekte, morfogenez ve farklılaşmada rol oynayabilmektedir (48).

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, sıçanların prenatal 15, 17, 19. gün fetüslerinde ve postnatal 1, 2, 4 günlük yavrularında karaciğer İto hücrelerini tespit etmek için, immün boyama yöntemi uygulandı. Bu amaçla elde edilen 4-5 µm kalınlıktaki parafin blok doku kesitlerine uygulanan primer antikor ( $\alpha$ FGF) antijenlere bağlandı, daha sonra peroksidaz enzimiyle konjuge edilmiş sekonder antikor bu komplekse bağlandı. Bundan sonra da ortama substrat AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) eklenerek gözle görülebilir ürün ortaya çıktı.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışmada, her kafeste ağırlıkları 190-210 gram arasında değişen 3 adet dişi, 1 adet erkek olmak üzere toplam 7 kafeste 21 dişi, 7 erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır (n=28). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar beslenmesi için su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

##### 3.1.2. Fetüslerin elde edilmesi:

Vajinal smear yöntemi ile östrus döneminde olan dişi sıçanlarda yığınlar oluşturan çekirdeksiz poligonal şekilli süperfisial hücreler görüldükten sonra, 16 saat süre ile erkek sıçanlarla birarada bırakılmışlardır. Erkek sıçanlar ayrıldıktan sonra tekrarlanan smear'da sperm hücreleri görülen sıçanlar gebeliğin birinci gününde kabul edilmişlerdir.

#### 3.2. Metod:

##### 3.2.1. Histolojik çalışmalar:

Takip edilen sıçanların prenatal 13. günde abdominal ultrason yöntemi ile gebe olup olmadıkları kesinleştirilmiştir. Gebe olanlardan hergün bir sıçan olmak üzere eter ile anestezi altına alınıp abdominal kesi yapılarak uteruslarından 15-17-19. günlerde fetüsler alınmıştır. Postnatal olarak ise doğumdan sonra 1-2-4. günlerde

bir yavru eter ile öldürülmüştür. Elde edilen fetüs ve yavrular, ekstremiteler ve başları kesilmiş ve derisi soyulmuş olarak fiksasyon için hemen % 4'lük nötral formalin içine konmuşlardır. 1 saat akarsuda yıkama işleminden sonra alkol serileri, şeffaflandırma, infiltrasyon ve parafine gömme gibi histolojik yöntemler uygulanmıştır.

#### **3.2.1.1.Fetüs ve yavruların fiksasyonu:**

Elde edilen tüm fetüs ve yavrular % 4'lük nötral formalin solüsyonuna alınıp tespit edildi.

Fiksatif içeriği:

- Formalin % 40'lık                      1 hacim
- Su    9 hacim

#### **3.2.1.2.Dehidratasyon:**

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
% 50	1 saat
% 70	1 saat
% 80	1 saat
% 90	1 saat
% 96	1 saat
% 100	1 saat

#### **3.2.1.3..Şeffaflandırma:**

<u>Ksilol</u>	<u>15 dakika</u>
<u>Ksilol</u>	<u>15 dakika</u>

**3.2.1.4..İnfiltrasyon:**

Ksilol + parafin 1:1 (60°C etüvde)	15 dakika
Parafin	2 saat

**3.2.1.5.Gömme:**

Sert parafin

**3.2.2. İmmünohistokimyasal çalışmalar:****a) Kesitlerin elde edilmesi:**

Elde edilen tüm sıçan fetüs ve yavrularından yukarıdaki rutin histolojik yöntemler ile parafin bloklar oluşturuldu. Bunlardan mikrotom ( leica tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 4-5 µm kalınlığında seri kesitler, önceden poly-l-lizin ile kaplanmış lamlara alındı.

**b) Lamların Poly-L-Lizin ile kaplanması:**

- 72 ml distile su
- 8 ml poly-l-lizin

Lamlar önce zembile dizildi ve lamları temizlemek amacıyla asit alkolden geçirilip, % 50'lik alkolde bir süre bekletildi. Asit alkol; saf alkole (% 100'lük) 2-3 damla asit ilave edilmesiyle hazırlandı. Zembildeki lamlar asit alkol içerisinde bir süre bekletilip, % 50'lik alkolle muamele edildi. Daha sonra lamlar distile su içine alınıp yıkandı. Yıkama sonrası lamlar poly-l-lizin içine alınıp etüvde bir müddet kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.



**İmmün boyamada kullanılan kimyasal maddeler:****Primer antikor:**

- ❖ FGF-1 (H-125): sc-7910

Dilüsyon solüsyonu olarak *fosfat tampon solüsyonu* (PBS; Phosphate Buffer Solution) kullanılmıştır. Bu solüsyonun hazırlanışı:

❖ Sodium chloride (NaCl)	16 gr
❖ Natrium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	3,58 gr
❖ Kalium dihydrogen phosphate ( $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$ )	0,816 gr
❖ Distile su	2000 ml

**Sekonder antikor:**

Biotinle işaretlenmiş olarak;

- ❖ Goat anti-rabbit IgG sc-2040

**Mikrodalga solüsyonu:**

❖ Sitrik asit	9 ml
❖ Sodyum sitrat	41 ml
❖ Distile su	450 ml

**Sitrik asit solüsyonu:**

* Sitrik asit	2,1 gr
* Distile su	1 lt
* Sitrik asit distile su içinde eritilir ve karıştırılır. PH: 6 olacak şekilde 2M NaOH ilave edilir.	

**Hidrojen peroksit solüsyonu:**

❖ Methanol	50 ml
❖ Hidrojen peroksit	168 �l
❖ Methanol ve hidrojen peroksit karıştırılır.	

**Kromojen:**

* AEC (3-amino-9-ethyl carbazole)
-----------------------------------

**Zıt Boyama için Hematoksilen Hazırlanması:**

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır.

**Mayer's haemalum:**

❖ Aluminium potassium sulphate (K.N: 7167, Sigma)	50 gr
❖ Haemotoxylin (K.N: H 9627, Sigma)	1,0 gr
❖ Sodium iodate (NaIO <sub>3</sub> ; K.N: S 407, Sigma)	0,2 gr
❖ Chloral hydrate (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ; K.N: C 8383, Sigma)	50 gr
❖ Distile su	1000 ml
❖ Sitrik asit (monohydrate) (K.N: C 7129, Sigma)	1,0 gr
❖ 1,0 gr hematoksilen 1000 ml distile suda eritildi. 0,2 gr Sodyum iyodit ilave edildi. Bu karışım, 50 gr Aluminyum potasyum sülfat ile manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra, kloral hidrat ve sitrik asit ilave edildi.	

### İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

- ❖ 4-5 µm kalınlığında elde edilen kesitler etüvde 60°C' de 30-60 dakika bekletildi (parafin eriyinceye kadar).
- ❖ Daha sonra sırasıyla ksilol ve alçalan alkol serilerinden geçirildi, çeşme suyu ve distile su ile yıkandı.
- ❖ Sitrik asit içerisindeki dokulara 5 dakika mikro dalga (Med High) uygulandı.
- ❖ 15 dakika oda sıcaklığında, 15 dakika buzdolabında soğutuldu.
- ❖ %0,1 lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 dakika süreyle uygulandı.
- ❖ PBS' de 3x5 dakika yıkandı.
- ❖ Dokular 1 saat süreyle oda ısısında 1:60 oranında dilüe edilmiş primer antikor ile nemli ortamda inkübe edildi.
- ❖ PBS'de 3x5 dakika yıkama.
- ❖ Biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor ile dokular 45 dakika inkübe edildi.
- ❖ PBS'de 3x5 dakika yıkama.
- ❖ Streptavidin damlatılarak 30 dakika inkübe edildi.
- ❖ PBS'de 3x5 dk yıkandı.
- ❖ AEC ile reaksiyon verinceye kadar muamele edildi.
- ❖ Distile su ile yıkandı.
- ❖ Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
- ❖ 3 dk çeşme suyu ile yıkandı.
- ❖ 30 sn kadar PBS'de tutularak gliserol jelatin ile kapatıldı.

### 3.3.Değerlendirme:

İmmünohistokimyasal boya uygulanmış sıçan fetüs ve yavrularının karaciğer kesitlerindeki İto hücrelerinde Fibroblast Growth Faktör-1(FGF-1)'in hücreyel dağılımlarını saptamak için; kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak yarı kantitatif değerlendirme sistemi kullanıldı. Bu amaçla aşağıdaki değerlendirme cetveli kullanılmıştır.

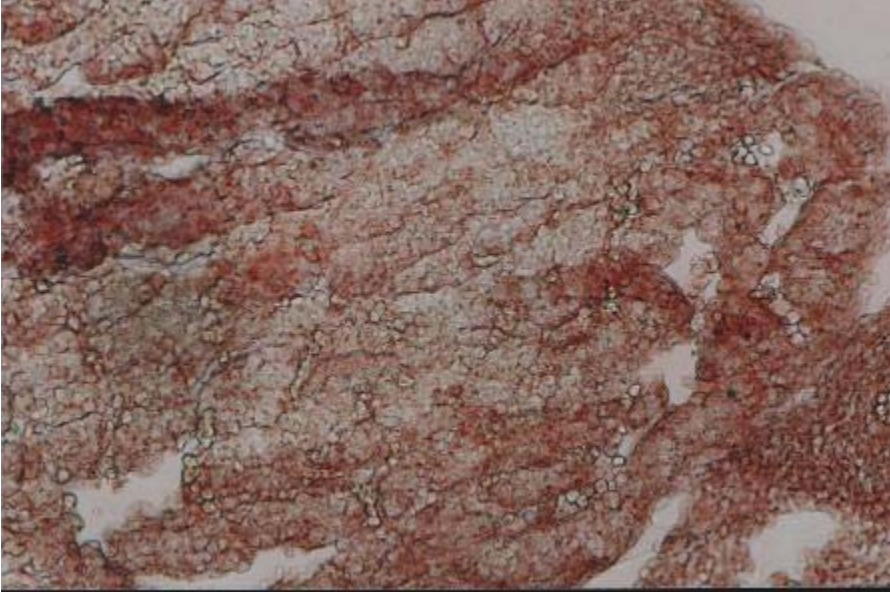
- (-) : Boyanma yok
- (-/+ ) : Çok zayıf boyanma
- (+) : Zayıf boyanma
- (++) : Orta derecede boyanma
- (+++ ) : Kuvvetli boyanma

#### 4. BULGULAR:

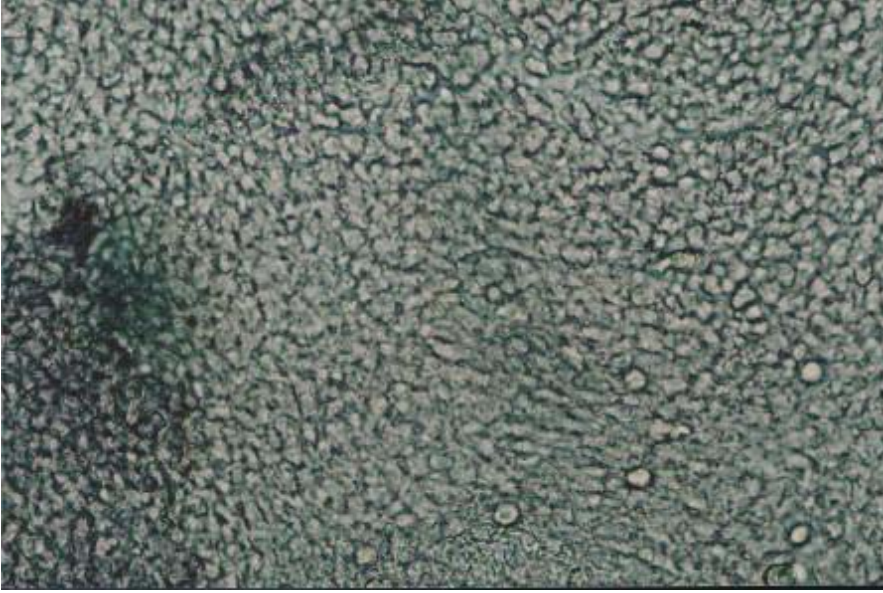
aFGF primer antikoru kullanılan immün boyamada, karaciğer gelişimi ve farklılaşmasına paralel olarak yapılan İto hücrelerinin değerlendirilmesi; yıldızlı hücrelere ait aFGF aynı zamanda hepatositler tarafından da eksprese edildiğinden hepatosit ve beraberinde İto hücreleri de ele alınarak yapıldı. Karaciğer gelişiminde HGF, TGF- $\alpha$ , aFGF'yi de içeren birçok sitokin ekspresyonu üst üste olmaktadır. Bu bağlamda değerlendirmemezi karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde yaptık.

##### 4. 1. Prenatal 15. gün sıçan karaciğeri:

Prenatal 15 günlük sıçanlarda karaciğerin değerlendirilmesinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında özellikle belli bölgelerdeki hepatositlerde (+++) reaksiyon gözlenirken diğer bölgelerdeki hepatositlerde (++) reaksiyon gözlendi. Bu reaksiyonu aynı şekilde sinuzoid ve Disse aralığı çevresindeki bölgelerde net bir şekilde çizgi tarzındaki işaretlemelerle (+++) ve bazı bölgelerde (++) olarak izledik (Resim 1a).



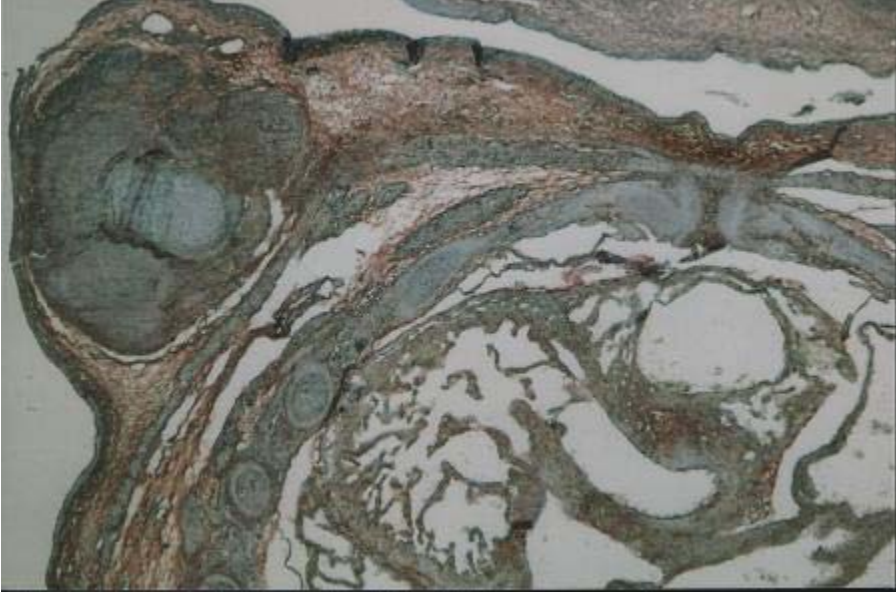
**Resim 1a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 15 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 20)



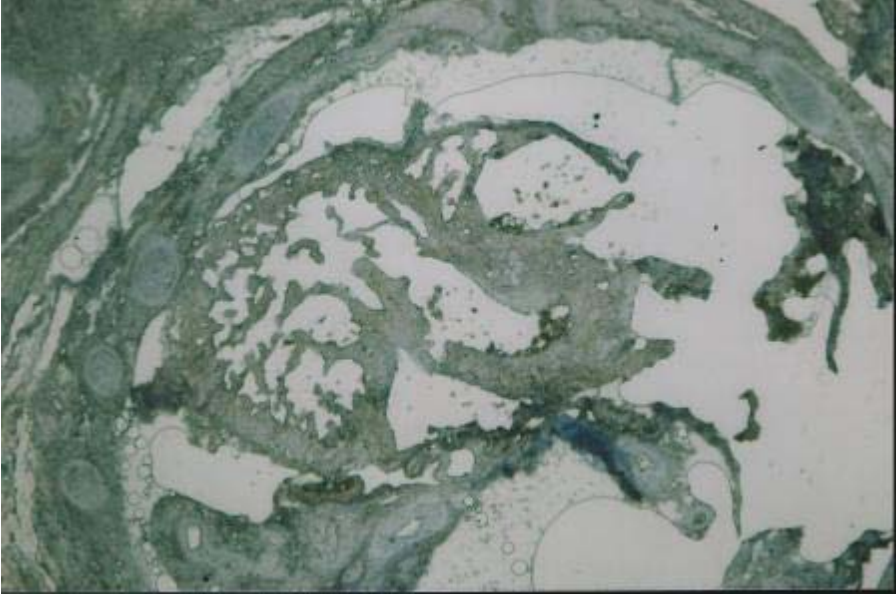
**Resim 1b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 15 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 40)

**4. 2. Prenatal 17. gün sıçan karaciğeri:**

Prenatal 17 günlük embriyoların karaciğerinin immunohistokimyasal olarak boyanmasında sinuzoid ve Disse aralığıyla uyumlu olmak üzere (+) reaksiyon veren bölgeler tespit edildi. Hepatositlerde herhangi bir reaksiyona rastlanmadı. Fakat bağ dokusu, mezoderm kaynaklı alanlarda (+) reaksiyonlar belirlendi. Bu immun işaretlenme homojen olarak dağılmamıştı. Özellikle bağ dokusu ve elemanları ile mezodermal kaynaklı yapıların bulunduğu kısımlarda immun boyanma daha netti. Diğer bölgelerde herhangi bir reaksiyona rastlanmadı (Resim 2a, 3a).



**Resim 2a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 4)

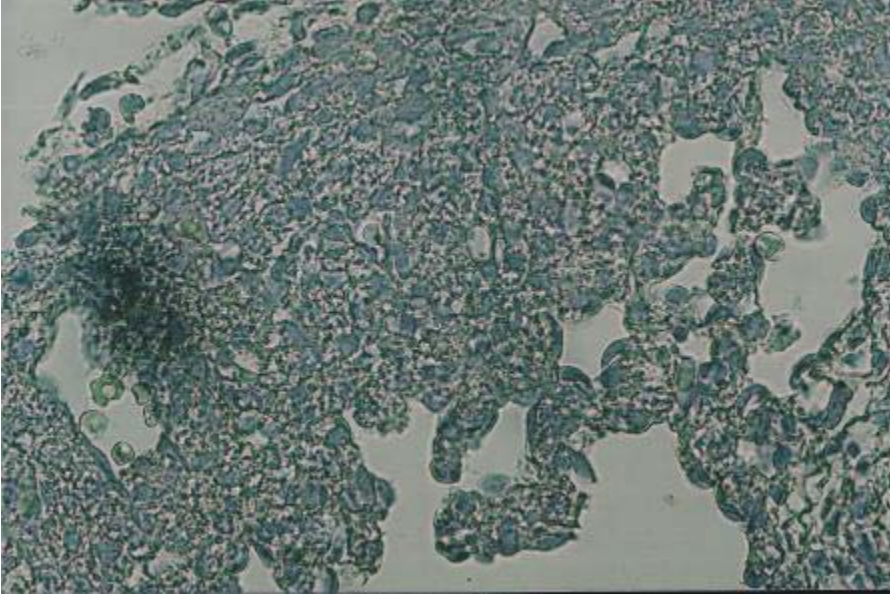


**Resim 2b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 4)





**Resim 3a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 40)



**Resim 3b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 17 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 40)

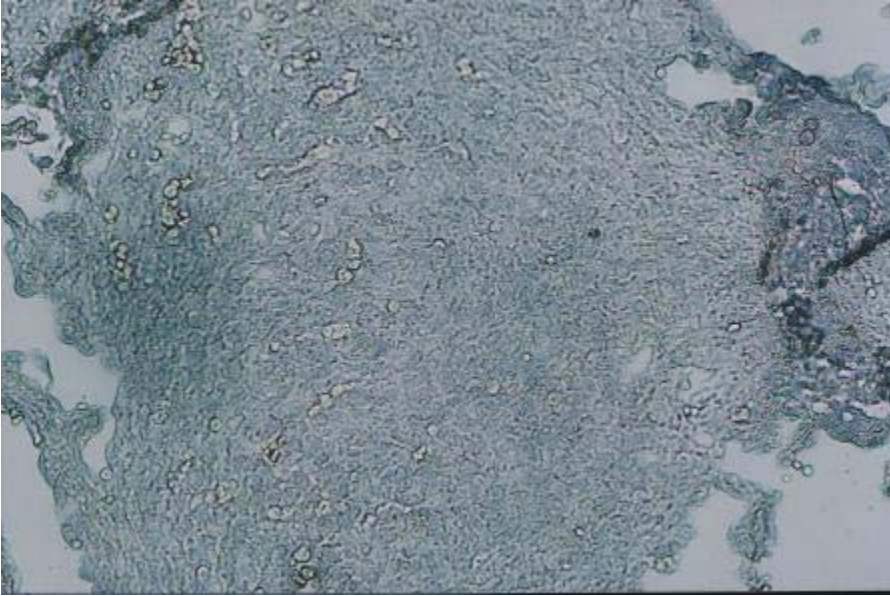


**4. 3. Prenatal 19. gün sıçan karaciğeri:**

Prenatal 19 günlük embriyoların immunohistokimyasal olarak karaciğer incelemelerinde, Disse aralığı ile uyumlu bölgelerde ve sinuzoidleri sınırlandıran alanlarda (+) reaksiyon gözlendi. Çok az bir bölgedeki hepatosit hücre kümelerinde (++) reaksiyon görüldü. Fakat diğer bölgelerdeki hepatositlerde böyle bir reaksiyon gözlenmedi (Resim 4a, 5a).



**Resim 4a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 20)



**Resim 4b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 20)



**Resim 5a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 40)

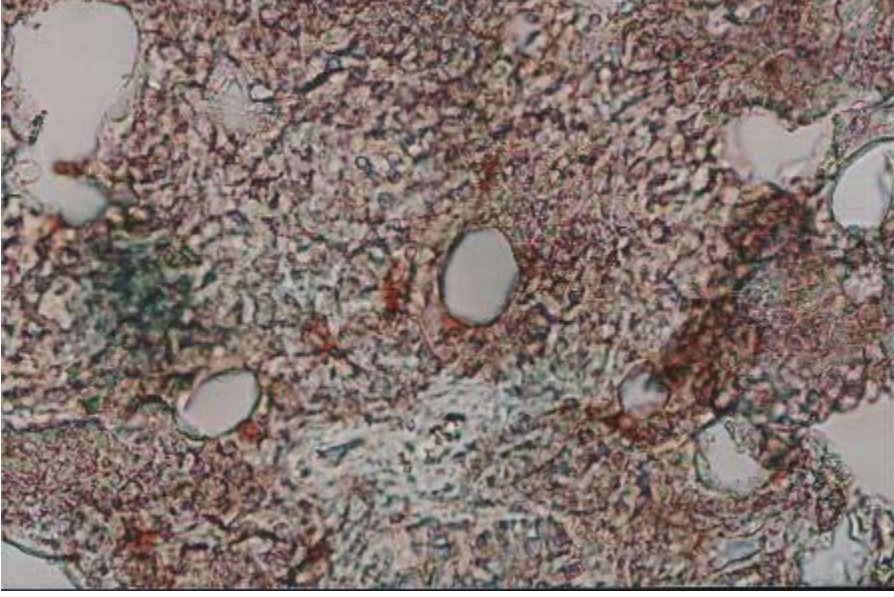


**Resim 5b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 19 günlük sıçan fetüsüne ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoxidaz x 40)

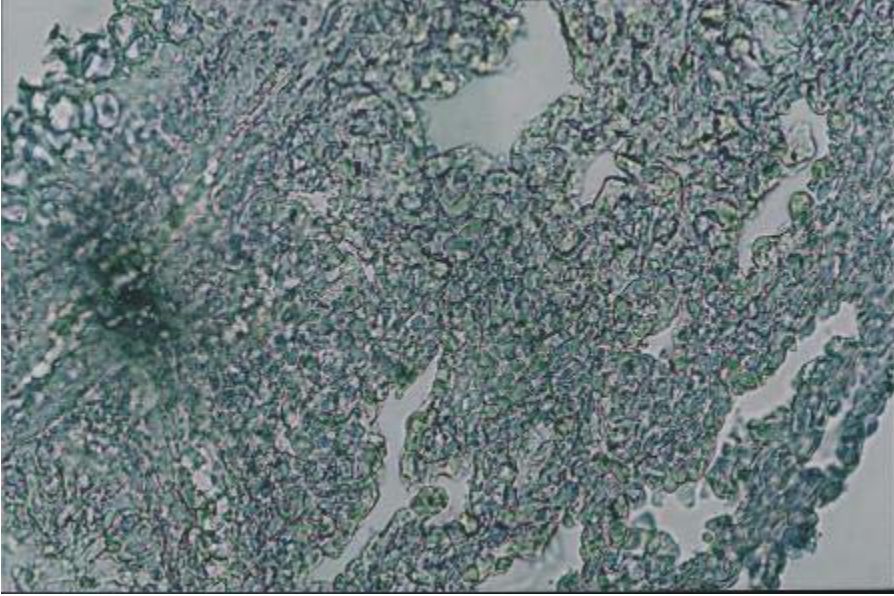
#### **4. 4. Postnatal 1. gün sıçan karaciğeri:**

Postnatal 1. gün sıçan karaciğerleri kontrol grubunda hepatositlerin etrafındaki bağ dokusu ve kan damarlarının yapısı diğer kontrol gruplarındaki karaciğerlere göre daha açık ve net bir Şekilde izlendi. Deney grubu ile karşılaştırıldığında özellikle sentral ven çevresinde olmak üzere bazı bölgelerdeki hepatosit gruplarında (+) ile (++) arasında değişen immun boyanma tespit edildi. Yine sinuzoidlerin etrafını çevreleyen bölgelerde (+) ile (++) arasında değişen reaksiyon söz konusuydu. Stromada bu artışı net bir Şekilde izleyemedik (Resim 6a).





**Resim 6a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 1 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 40)



**Resim 6b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 1 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 40)

**4. 5. Postnatal 2. gün sıçan karaciğeri:**

Postnatal 2. gün sıçan karaciğerinin immunohistokimyasal olarak incelenmesinde kontrol grubuna göre hem stroma hem parankim düzeyinde pozitif immun boyanma tarzında önemli değişiklikler izlendi. Hepatositlerin büyük bir kısmında (++) ile (+++) reaksiyon veren boyanma gözlendi. Sinuzoidleri sınırlandıran yapılar ve Disse aralığı ile uyumlu bölgelerde net bir Şekilde yine (++) ile (+++) arasında değişen boyanma görüldü. Diğer gruplara oranla (prenatal 17, 19, postnatal 1. gün) daha pozitif bir boyanma söz konusuydu (Resim 7a).



**Resim 7a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 2 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 20)

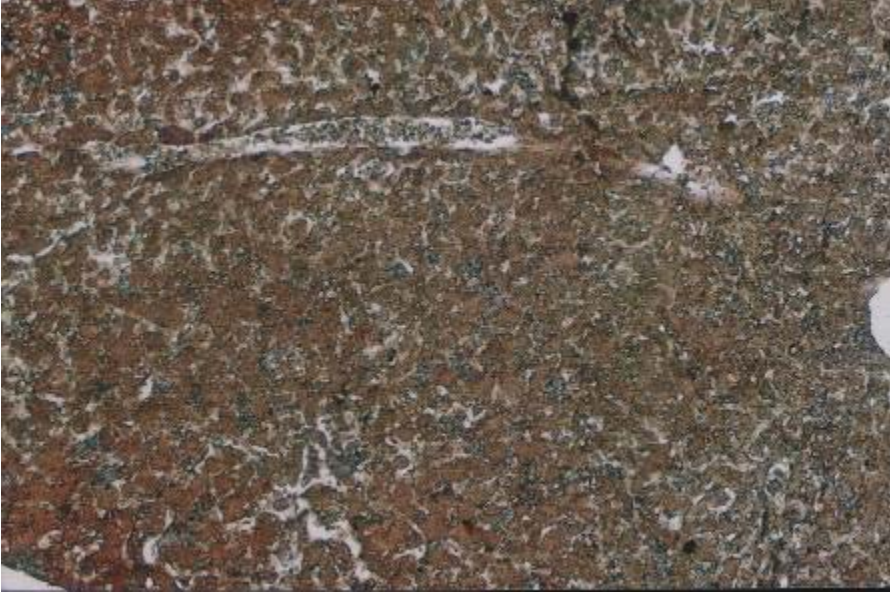


**Resim 7b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 2 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 20)

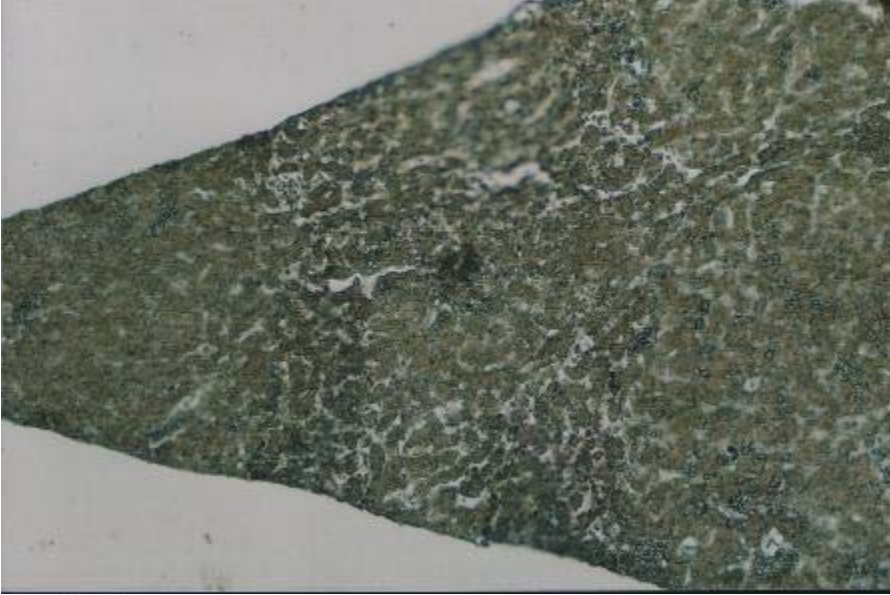
**4. 6. Postnatal 4. gün sıçan karaciğeri:**

Postnatal 4. gün sıçan karaciğerinin immunohistokimyasal incelenmesinde, kontrol grubuna göre bariz bir farklılık gözlendi. Tüm sahalarda homojen bir dağılım söz konusuydu. Deney grubunda adeta stroma ile parankim birbirinin içine girmiş gibi (++++) lik boyanma tespit ettik. Sinuzoidal boşluklar net bir şekilde seçiliyordu. Fakat sentral ven çevresinde sınırlayıcı bir immun boyanma gzleyemedik. Hepatositlerle birlikte bağ dokusu da dahil olmak üzere boyanmada bir devamlılık sözkonusuydu (Resim 8a).





**Resim 8a:** aFGF için immun boyama uygulanmış 4 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 10)



**Resim 8b:** Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış 4 günlük sıçana ait karaciğer kesiti. (ABC-immunoperoksidaz x 10)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ito hücreleri 1952 yılında Ito ve Nemato tarafından sitoplazmalarındaki geniş yağ damlacıkları ile karakterize hücreler olarak tanımlanmıştır (49). 1971 yılında Wake, stellat hücrelerin gümüşleme methodu ile boyanmasının A vitamininin kaybına yol açtığını ortaya koymuştur (50). 1984 yılında Hendriks ve arkadaşları ise bu hücrelerin asıl fonksiyonlarının A vitamininin depolanması olduğunu ortaya koymuşlardır (51).

İto hücreleri Disse aralığında yer almaktadırlar. Hepatositler ve endotel hücreleri ile yakın temas halindedirler (1, 2, 52-54).

Vimentin, desmin ve  $\alpha$ -SMA eksprese etmeleri esas alınarak İto hücrelerinin mezenşimal kaynaklı oldukları düşünülmektedir (7, 55, 56).

Ito hücreleri, hücre dışı matris yapım ve yıkımı, transforming growth faktör  $\beta_1$  (TGF-  $\beta_1$ )'in ve hepatosit growth faktör (HGF)'ün üretilmesi ve karaciğerdeki mikrovasküler düzenlemeden sorumlu hücre fonksiyonlarını yerine getirmektedirler (9, 57-61).

Ito hücreleri, hepatik farklılaşma ve karaciğer gelişiminde HGF, TGF- $\alpha$  ve aFGF'ü içeren birçok sitokin ekspresyonunu üst üste gerçekleştirmektedir. Growth faktörler arasında, HGF parakrin yolla işlev yaparken, TGF- $\alpha$  ve aFGF otokrin ve parakrin mekanizmaların her ikisi ile de işlev yapar (41, 62-64).

Cassiman ve arkadaşları tarafından hepatik stellat hücrelerin fibrosisteki ve rejenerasyondaki rollerine ilişkin kanıtlar birlikte değerlendirildiğinde, merkezi sinir sisteminin rejenerasyon ve fibrosisi hepatik stellat hücreler yoluyla etkilediği öne sürülmüştür. Merkezi sinir sistemi son organ efektörü olarak hepatik stellat hücreleri kullanarak hücre dışı matris bileşenlerinin üretimini ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlamaktadır (7).

Hücrelerin şekillerine ve lokalizasyonlarına göre ayrımı kesin bir şekilde mümkün olmamaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için bir dizi moleküler belirtecin belirli bir hücre tipini tanımlamak amacıyla karşılaştırılması gerekmektedir (20).

Fetal sıçan karaciğerinde desminin immünlokalizasyonu, gebeliğin 12. gününden itibaren çok sayıda karaciğer hücresinde gösterilmiştir. Yaklaşık gebeliğin 20.

gününde yetişkin sıçan karaciğerindekiler ile aynı yoğunlukta desmin içeren hücreler bulunmuştur. Özellikle gebeliğin 12-13. günlerinde desmin içeren 2 çeşit karaciğer hücresi gösterilmiştir:

- \* Hücrenin her yerinde basket potası şeklinde ağ oluşturan ara filamanları ile hepatositler,
- \* Bitişik hücreler arasında yer alan ince-uzun oluşumları ve daha kuvvetli boyanmış ara filamanları ile İto hücreleri.

Desmin pozitivitesi yönünden, gebeliğin 14. gününden sonra hepatositler azalır ve 18. günden sonra sadece İto hücreleri kalır (24). Hepatositler sitokeratin ve desmin, İto hücreleri ise vimentin ve desmin içerir (24, 25).

Sıçanlarda fetal İto hücreleri ve hepatositlerin gebeliğin 12 ve 13. günlerinde bazı ortak özellikleri vardır:

- a) Az yada çok yıldızimsı şekillidirler.
- b) Yağ damlacıkları ve muhtemelen A vitamini içerirler (24).
- c) İto hücrelerinde bulunan desmin aynı zamanda sitokeratin C8 ve C18'i içeren fetal hepatositlerde de vardır (24, 25).

İto hücreleri normal yetişkin karaciğerde hepatosit growth faktörü (HGF) eksprese etmektedirler ve bu şekilde parakrin yolla hepatosit artışını düzenliyor olabilirler. Gelişen karaciğer dokusunda desmin pozitif fetal İto hücrelerinin yüksek yoğunluğu, etraftaki hepatositlerin çoğalımı için gerekli olmasındandır. Bu hücreler, aynı zamanda hücre farklılaşmasında çok önemli yeri olan hücre dışı matriksi ürettiklerinden, hepatosit olgunlaşmasını kontrol etmektedirler (24). Bizim çalışmamızda da aFGF hem İto hücresi hem de hepatositler tarafından eksprese edildiğinden immunohistokimyasal değerlendirmesi bu iki hücre grubu birlikte ele alınarak yapıldı.

Bu sonuçlar, İto hücrelerinin miyojenik ve fibrojenik özelliklerinin her ikisini de taşıdığını ve liposit veya miyofibroblastların özgün fonksiyonlarını koruyan desmin pozitif hücreler olduklarını göstermiştir (26, 65, 66).

Hepatik sinuzoiddeki lümen, endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri ile sınırlanmıştır. Sinuzoidi çevreleyen hücreler ve hepatik parankimal hücreler arasında Disse aralığı olarak adlandırılan perivasküler aralık mevcuttur. Hepatositlerin çok sayıdaki mikrovillusları boyunca, İto hücrelerinin uzantıları,

aralıktaki sinuzoidal duvara paralel olarak gözlenmişlerdir. Lokalizasyonları göz önünde tutulursa, bunların İto hücrelerinin gövde ve uzantıları olması olasıdır (27). aFGF için yapmış olduğumuz immun boyamada, özellikle sinuzoidal alanlar ve Disse aralığı çevresinin daha açık ve net bir şekilde pozitif reaksiyon vermesi dikkatimizi çekmiştir.

İnsanlarda, karaciğer primordiyumu, gebeliğin 4. haftasının somit ve nöral tüp periyoduna denk gelen 20 somitli embriyonda bulunmaktadır. Ön bağırsağın distal ucundaki endodermal epitelden gelişmiştir (16). İnsanlarda gebeliğin 5. haftasında, fare ve sıçanlarda gebeliğin 10. gününde, kalınlıkları 1-2 veya daha fazla hücre içeren gevşek karaciğer hücre kordonları septum transversumun mezenşimal dokusuna doğru büyümektedir. Karaciğer hücre kordonları arasında primitif sinuzoid benzeri yapılar görülmektedir. İnsanlarda gebeliğin 6-8. haftasında veya fare ve sıçanlarda 12-14. günlerde hepatik sinuzoidlerin elemental bileşenleri belirlemektedirler. Bununla birlikte perisinuzoidal kollajen fibrilleri nadiren görülmektedir. Sinuzoidleri aralıksız bir hat haline getiren endotel hücreleri ise mitotik şekillerde görülürler. Disse aralığı genelde dardır ve bu darlık endotel hücreleri, gelişmekte olan karaciğer hücreleri ve olgunlaşmamış hematopoietik hücreler arasında yakın temaslara neden olmaktadır (16, 17, 67). Bizim çalışmamızda 15 günlük sıçan fetüsünün karaciğerinde belli bölgelerdeki hepatositlerde (+++) reaksiyon ve sinuzoid ile Disse aralığı çevresindeki bölgelerde çizgi tarzında net bir şekilde yine (+++) immun boyanma gözlenmesi bu bulgular ile paralellik göstermektedir.

Bankston ve Pino; sıçanlarda 10-16 günlük fetal sıçan karaciğerlerindeki sinuzoidlerin hücre içi birleşme (junction) sergileyen aralıksız endotel hücreleriyle çevrili olduklarını ve gebeliğin 17. gününde aralıklı endotel hücrelerin ilk olarak görünüp ondan sonra sayıca kademe kademe arttıklarını tespit etmişlerdir. Bazal membran, sıçanlarda gebeliğin 13-14. günüyle birlikte ortaya çıkmaktadır. Gebeliğin 12-14. günlerine kadar sıkı bağlantı noktalarına sahip aralıksız endotel hücrelerinin var olduğu gösterilmiştir. Gebeliğin 15. gününden başlamak üzere aralıklı/pencereli endotel hücreleri gözlenmiştir. Yapılan bütün çalışmaların ortak sonucu; yetişkin karaciğerde olduğu gibi fetal hepatik sinuzoidal duvarlarda bazal membranın gözlenmediğidir. Endotel hücrelerinin gelişimi ile ilgili olarak, gebelik esnasındaki

en belirgin değişiklik erken gelişim aşamasındaki aralıksız hücrelerin, aralıklı hücrelerle yer değiştirmesidir. Bu da, farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 17. günü, insanlarda da 12. haftada gerçekleşmektedir. Fare ve sıçanlarda doğumdan sonra 4-5. günlere kadar sinuzoidal ve perisinuzoidal yapılar tamamıyla oluşurlar (16, 68). Biz de prenatal 17 günlük embriyoların karaciğerinin immunohistokimyasal olarak boyanmasında sinuzoid ve Disse aralığı ile uyumlu olmak üzere özellikle bağ dokusu ve mezoderm kaynaklı alanlarda homojen olarak dağılmış (+) lik net bir işaretlenme gözledik. Özellikle mezodermal alanların boyanması İto hücresi olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Çalışmamızdaki 17. gün sıçan karaciğer bulguları bu literatürle paralellik arz etmektedir.

Erken gebelik döneminde insan karaciğer hücre kordonları, septum transversumun mezenşimal dokusunu istila ederler. Septum transversumdaki mezenşimal hücreler perisinuzoidal aralığa yerleşirler ve İto hücreleri haline gelirler (16, 17). İto hücrelerinin nükleusları ovoid (yumurta) şeklindedir ve gelişmekte olan hematopoietik hücreler tarafından iyice sıkıştırılmış vaziyettedir (16). Sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulumun homojen ve elektron yoğun materyalle dolu hafif genişlemiş kısa tubuler profilleri bulunmaktadır. Aynı zamanda birkaç küçük mitokondriyon, dağınık haldeki serbest ribozomlar ve düzensizce seyreden mikrofilamanlar da görülebilmektedir. Birkaç yoğun cisim ve primer lizozom bulunmakta fakat hiçbir sekonder lizozom gözlenmemektedir (16, 18). Fetal İto hücrelerinin sıklığı, yetişkin insan karaciğerlerindekiinden daha yüksektir. Gebeliğin bu aşamasında İto hücrelerinin ince yapısı, yetişkin karaciğerlerdeki fibroblastlara benzemektedir. Bunun nedeni ise, fibroblastlar ve İto hücrelerinin her ikisinin de septum transversumdaki mezenşimal hücrelerden köken almasıdır. Gebeliğin farelerde 15. günü civarında, sıçanlarda 16-18. günler civarında İto hücreleri artık elektron yoğun materyalle ve iyi gelişmiş Golgi kompleksiyle dolu ve önemli ölçüde genişlemiş granüllü endoplazmik retikuluma sahiptirler. Ayrıca bu hücrelerin plazma zarı altındaki bölgelerinde bulunan mikrofilamanlarda da hafif bir artış görülür. Her ne kadar gebeliğin bu aşamasında İto hücreleri, tipik miyofibroblastların içerdiklerinden daha az miktarda mikrofilaman ve plazma zarı altında yoğun alanlar içermekte iseler de, bu özelliklerinin tipik miyofibroblastların özelliklerine benzediği görülür. Bu durum fetal İto hücrelerinin miyofibroblast benzeri transformasyonu

olarak değerlendirilmektedir (16, 69). Bu literatüre göre prenatal 19 günlük sıçan İto hücreleri, hücre organel gelişimini büyük oranda tamamlamış ve miyofibroblastik özellikler sergilemektedirler. Bizim çalışmamızda prenatal 19 günlük embriyo karaciğerlerinin immunohistokimyasal olarak incelenmesinde Disse aralığı ile uyumlu bölgelerde, sinuzoidleri sınırlandıran alanlarda (+) reaksiyon gözlenirken çok az bir bölgedeki hepatosit hücre kümelerinde (++) reaksiyon görüldü.

Civciv embriyosu karaciğerinde İto hücrelerinin gelişimi, elektron mikroskobu kullanılarak çalışılmıştır. Disse aralığındaki kollajen fibriller hemen 6 günlük civciv embriolarında görülmüştür. Bu aralık, primitif İto hücreleri olarak adlandırılan fibroblast benzeri hücreleri içermektedir. Bunlar çok sayıda serbest poliribozomlardan oluşan ince-uzun hücrelerdir. Aynı zamanda granüllü endoplazmik retikulum, Golgi aparatı ve 10 nm. lik mikrofilamentler de iyi gelişmiştir. A vitamini fluoresansı ve lipit damlacıkları, A vitamini verilmiş ve kontrol grubundaki hayvanların her ikisinde de inkübasyonun 9. gününde primitif İto hücrelerinde görülmeye başlarlar. Disse aralığındaki primitif İto hücreleri, A vitamini alma ve depolamadan daha önce kollajen fibrillerini üretme yeteneği kazanırlar. Yağ damlacıklarını içeren İto hücrelerinin embriyonik yaşları ile beraber sayıları da artar ve perisinuzoidal hücrelerin yaklaşık %40-50 sinde inkübasyonun 21. gününde A vitamini damlacıkları vardır (18). Çalışmamızda postnatal 1. gün sıçan karaciğeri kontrol grubunda hepatositlerin etrafındaki bağ dokusu ve kan damarları diğer kontrol grupları ile kıyaslandığında daha açık ve net bir şekilde görülmektedir. Deney grubu ile karşılaştırıldığında ise özellikle sentral ven çevresindeki hepatosit gruplarında ve sinuzoidlerin etrafını çevreleyen bölgeler olmak üzere (+) ile (++) arasında değişen immun boyanma tespit edildi. Stromada ise bu artışı net bir şekilde izleyemedik.

Asidik fibroblast growth faktör (a-FGF), heparin sülfat proteoglikanlarına yüksek afinite gösteren growth faktörler ailesindedir. Bazik ve asidik FGF'nin her ikisi de erken embriyonik gelişimde önemli rol oynar ve hücrelerel değişim, göç ve anjiyogenezdeki bazı hücreler için de uyarandır. Matrikse bağlı heparin sülfat proteoglikanları, FGF'ler için yüksek kapasiteli reseptörlerdir. FGF'ler proteoglikanlarından heparinaz, heparatinaz veya yüksek tuz konsantrasyonu ile

salgılatılabilir. Yüksek afiniteli reseptörlere FGF'lerin bağlanması birçok hücrede (hepatositleri de kapsayan) biyolojik cevaba neden olur (42, 70, 71).

aFGF transkripsiyonu normal dinlenen karaciğer hücrelerinde düşük seviyededir, fakat kısmi hepatektomi sonrası bariz bir artış olur (42).

Postnatal karaciğerde çok açık bir şekilde 2 veya 3 hücre kalınlığındaki hepatik kordonların normal hepatik yapıya geçişinde aFGF ekspresyonunun yüksek bir seviyede gerçekleştiği gösterilmiştir. Farklı olarak prenatal period sırasında karaciğer hala hemopoietik bir organdır, çok az sayıda sinuzoid mevcuttur ve düşük seviyede aFGF transkriptleri bulunabilirler (42).

Asidik fibroblast growth faktör ve bunun reseptör sistemlerinin karaciğer rejenerasyonu, hepatik farklılaşma ve ontogenez sırasındaki rollerini tanımlamak için Northern blot analizi ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanılarak FGF reseptör 1 (flg) ve FGF reseptör 2 (bek) nin ekspresyonu ve hücrel lokalizasyonu araştırılmıştır. Normal yetişkin karaciğerinde düşük seviyede bek reseptörü bulunurken, flg reseptörü yoktur. Kısmi hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu sırasında flg reseptörü az bir artış gösterirken, bek reseptörü için transkriptler önemli derecede artmıştır. Flg ve bek her ikisi de gelişen karaciğerde yüksek seviyede eksprese edilmektedir. Flg, embriyonik karaciğerde yüksek seviyede eksprese edilmiştir ve ayrıca doğumdan sonra da artmıştır. Oysa, bek'in en önemli artışı, karaciğer gelişiminin postnatal aşamasında gerçekleşmektedir (43). Bizim çalışmamızda, postnatal 2. gün sıçan karaciğerinin aFGF antikorunu kullanarak immunohistokimyasal olarak incelediğimizde hepatositlerin büyük bir kısmında, sinuzoidleri sınırlandıran yapılarda ve Disse aralığı ile uyumlu bölgelerde (++) ile (+++) arasında değişen immun boyanma gözlemlendi. Bulgularımız, prenatal periyottan postnatal periyoda geçildiğinde aFGF ekspresyonunun arttığı yönündeki literatür bilgileri ile paralellik gösterdi.

Deneyler yetişkin karaciğerinde hepatik farklılaşma sırasında olduğu gibi yenidoğan hayvanlarda hepatik morfogenezin geç aşamalarında da aFGF ekspresyonunun en yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir (42). Çalışmamızda özellikle postnatal 4. gün sıçan karaciğerinde kontrol grubuna göre immun boyanmada bariz bir artış söz konusuydu. Deney grubunda adeta stroma ile parankim birbirinin içine girmiş gibi, homojen tarzda (+++) lik bir immun boyanma tespit ettik.

Sinuzoidal boşluklar net bir şekilde seçiliyordu. Fakat sentral ven çevresinde sınırlayıcı bir immun boyanma gözleyemedik. Hepatositlerle birlikte bağ dokusu da dahil olmak üzere boyanmada bir devamlılık söz konusuydu. Bu bulgu, hepatik morfogenezin geç aşamalarında aFGF ekspresyonunun çok yüksek olduğu yönündeki bilgileri doğrulamaktadır.

Normal yetişkin, neonatal ve fetal sıçan karaciğerinde, desmin, alfa düz kas aktinin ( $\alpha$ -SMA) sitokeratin no.8 (CK.8) ve no.18 (CK.18)' in ekspresyonu ve hücrel dağılımı kriyostat kesitlerde immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Gebeliğin 14. ve 15. günlerinde embriyonik karaciğerdeki hemapoiyetik olmayan hücreler güçlü desmin pozitifdir. Desmin immünoaktivitesi gebeliğin 16. gününden sonra gittikçe azalmaktadır. Desmin pozitif hücrelerin fetal ve erken neonatal gelişim sırasında hematopoiyetik hücreler ile yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. 16. gününden sonra ilkel hepatositler desmin negatif hale gelir. Desmin eksprese eden hücrelerin sayısı karaciğerde, embriyonik periyoddan neonatal döneme geçtiğinde artmıştır (21, 72-74). Bu çalışmada desmin için elde edilmiş olan sonuçlar, bizim çalışmamızdaki aFGF ekspresyonu ile birbirine çok benzemektedir.

İto hücrelerinin erken gebelik dönemindeki ince yapı özellikleri açısından fibroblastlara benzedikleri, daha sonraki fetal yaşamda (farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 16-18. günler civarında) ise kısmen miyofibroblast benzeri özellikler sergiledikleri kaydedilmektedir. Farelerde ve sıçanlarda doğumdan sonra 4-5. günlerde bazı farklılıklar halen varlığını sürdürmekte ise de, sinuzoid ve perisinuzoidal yapılar, endotelyal hücreler ve İto hücreleri morfolojik olarak yetişkin aşamadakilere çok benzemektedirler (16, 75).

Sonuç olarak sıçan fetüs ve yenidoğan karaciğerinin stroma ve parankim gelişimi beraberlik göstermektedir. Bu nedenle tek başına İto hücrelerinin aFGF primer antikoru kullanılarak gösterimi söz konusu olamadı. İto hücre gelişimi hepatosit gelişimi ile birlikte prenatal dönemin başında önce hızlanmakta, sonra azalıp doğuma yakın tekrar artış göstermektedir. Bu gelişim hızının doğumdan sonra göreceli olarak artmakta olduğunu izledik.



## ÖZET

### **Prenatal ve Neonatal Dönemlerde Sıçan Karaciğer Yıldızsı Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi**

İto hücresi karaciğerin parankimal olmayan hücrelerinden birisidir. Disse aralığında hepatositler ve endotel hücreleri ile yakın temas halinde bulunmaktadır. A vitamini retinil esterleri formunda karaciğer İto hücrelerinde depolanmaktadır. Bunun yanında hücre dışı matriks yapımı, transforming growth faktör  $\beta_1$  (TGF-  $\beta_1$ ), hepatosit growth faktör (HGF) ve asidik fibroblast growth faktör sentezleme fonksiyonları vardır. Vimentin, desmin ve  $\alpha$ - düz kas aktinin ( $\alpha$ -SMA) eksprese etmeleri esas alınarak İto hücrelerinin mezenşimal kaynaklı oldukları düşünülmektedir.

Bu çalışmada, karaciğer gelişimi sırasında aFGF'nin ekspresyonu ve lokalizasyonu incelenmiştir. Bu amaçla da indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılmıştır.

Gebeliğin 15. gününde orta düzeyde immün boyanma gözlenirken, sonraki günlerde azalmıştır. Doğuma yakın dönemde tekrar artmaya başlamış ve postnatal dönemde göreceli olarak artmaya devam etmiştir. Lokalizasyon yönünden ise özellikle sinuzoidal alan ve Disse aralığı çevresinde immün boyanma tespit edilmiştir.

Bulgularımız, aFGF'nin hepatik farklılaşma ve karaciğer gelişiminin özellikle postnatal aşamalarında önemli rol oynadığını göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Asidik fibroblast growth faktör, embriyoloji, İmmunohistokimya, İto hücresi, postnatal dönem.

## SUMMARY

### **Immunohistochemical Study of Rat Liver Stellate Cells on Prenatal and Postnatal Periods.**

Ito cell is one of the non-parenchymal cells of liver. These cells are located in the space of Disse in close contact with hepatocytes and endothelial cells. Vitamin A is stored in liver Ito cells in form of retinyl esters. In addition they have the functions like extracellular matrix production, transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF-  $\beta_1$ ), hepatocyte growth factor (HGF) and acidic fibroblast growth factor (aFGF) synthesize. Ito cells are considered to be of mesenchymal origin because of their vimentin, desmin and  $\alpha$ - smooth muscle actin expression.

In this study, the expression and localization of aFGF investigated during the development of liver. Therefore, indirect immunoperoxidase method is used.

On fifteenth day of pregnancy medium level immun staining is observed but after fifteenth day immun staining is seen to be decreased. Immun staining tended to increase again just before the birth and continued to increase gradually in postnatal period. In view of localization, immun staining is found especially on sinusoidal area and Disse spaces.

Our findings demonstrate that aFGF has an important role especially on postnatal periods of hepatic differentiation and liver development.

**Keywords:** Acidic fibroblast growth factor, embryology, immunohistochemistry, Ito cell, postnatal period.

## KAYNAKLAR

1. Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein – a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *Hepatology* 1996; 24: 719-730.
2. Taira K, Aoki T, Shibasaki S. A freeze-fracture study of the plasma membrane of the Ito cell in the normal rat liver. *Arch Histol Jpn* 1987; 50(1):95-102.
3. Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazi M, Mann J et al. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *Jid* 2985121R 2001; 3.
4. Tanuma Y, Ohata M, Ito T. Electron microscopic studies on the sinusoidal cells in the monkey liver. *Arch Histol Jpn* 1983; 46(3): 401-26.
5. Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Sato T, Sugiyama T et al. Storage of lipid droplets in and production of extracellular matrix by hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) in Long-Evans Cinnamon- like colored (LEC) rats. *Anat Rec* 2000; 258: 338-348.
6. Hautekeete ML, Geerts A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* 1997; 430(3): 195-207.
7. Cassiman D, Pelt JV, Vos RD, Lommel FV, Desmet V, Yap SH et al. Synaptophysin: a novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Pathology* 1999; 155(6): 1831-1839.
8. Kitamura Y, Tanigawa T, Katsumoto T, Tomita K, Wang H, Hirai K et al. Cell growth and differentiation of a novel mouse Ito (fat storing) cell line transformed by a temperature-sensitive mutant of simian virus 40. *hepatology* 1997; 26(2): 323-329.
9. Kiiasov AP, Gumerova AA. The Ito cells in ontogenesis and liver regeneration. *Tsitologiya* 2002; 44(4): 342-349.
10. Lalazar A, Wong L, Yamasaki G, Friedman SL. Early genes induced in hepatic stellate cells during wound healing. *Gene* 1997; 195(2): 235-43.
11. Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamaguchi M, Masuda T, Matsuura T et al. Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat storing) cells. *Lab Invest* 1995; 72: 731-739.
12. Ballardini G, Degli ES, Bianchi FB, Giorgi LB, Faccani A, Biolchini L et al. Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study. *Liver* 1983; 3(1): 58-63.
13. Tillmann T, Kamino K, Dasenbrock C, Germann PG, Kohler M, Morawietz G et al. Ito cell tumor: immunohistochemical investigations of a rare lesion in the liver of mice. *Toxicol Pathol* 1999; 27(3): 364-9.
14. Hirose M, Watanabe S, Oide H, Kitamura T, Miyazaki A, Sato N. A new function of Ito cells in liver morphogenesis: evidence using a novel morphogenic protein, epimorphin, in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 225(1): 155-160.
15. Moore KL, Persaud TVN. The developing human: clinically oriented embryology. 6. edition, Philadelphia: W.B. Saunders company, 1998: 279.
16. Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microscopy research and technique* 1997; 39: 336-349.
17. Enzan H, Hara H, Yamashita Y, Ohkita T, Yamane T. Fine structure of hepatic sinusoids and their development in human embryos and fetuses. *Acta Pathologica Japonica* 1983; 33(3): 447-466.
18. Tatsumi H, Fujita H. Fine structural aspects of the development of Ito cells (vitamin A uptake cells) in chick embryo livers. *Arch Histol Jpn* 1983; 46(5): 691-700.

19. Matsumoto E, Hirosawa K, Abe K, Naka S. Development of the vitamin A-storing cell in mouse liver during late fetal and neonatal periods. *Anatomy and Embryology* 1984; 169(3): 249-259.
20. Buniatian G, Hamprecht B, Gebhardt R. Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol Cell* 1996; 87: 65-73.
21. Kiassov AP, Eyken P, Pelt JF, Depla e, Fevery J, Desmet VJ et al. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation* 1995; 59(4): 253-8.
22. Buniatian G, Gebhardt R, Schrenk D, Hamprecht B. Colocalization of three types of intermediate filament proteins in perisinuzoidal stellate cells: glial fibrillary acidic protein as a new cellular marker. *Eur J Cell Biol* 1996; 70: 23-32.
23. Gard L, White F, Dutton G. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinuzoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol* 1985; 8: 359-375.
24. Vassy J, Rigaut JP, Briane D, Kraemer M. Confocal microscopy immunofluorescence localization of desmin and other intermediate filament proteins in fetal rat livers. *Hepatology* 1993; 17(2): 293-300.
25. Nizamov RS, Kiiasov AP, Alimov IM, Akhmetshin EI, Orlova OE. Immunohistochemical study of cell phenotypes in organ culture of the rat embryo liver. *Tsitologiya* 2001; 43(1): 92-99.
26. Tsutsumi M, Takada A, Takase S. Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. *Hepatology* 1987; 7(2): 277-84.
27. Fujimoto T, Singer SJ. Immunohistochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. *Histochemistry and cytochemistry* 1987; 35(10): 1105-15.
28. Sakamoto M, Ueno T, Kin M, Ohira H, Torimura T, Inuzuka S et al. Ito cell contraction in response to endothelin-1 and substance P. *Hepatology* 1993; 18(4): 978-83.
29. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 337-49.
30. Oikawa H, Masuda T, Kawaguchi J, Sato R. Three-dimensional examination of hepatic stellate cells in rat liver and response to endothelin-1 using confocal laser scanning microscopy. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(8): 861-72.
31. Geerts A, Eliasson C, Niki T, Wielant A, Vaeyens F, Pekny M. Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology* 2001; 33(1): 177-88.
32. Himeno H, Enzan H, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y. Myofibroblastic transformation of human fetal Ito cells. *Hepatology* 1995; 3: 59.
33. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y et al. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver. *Virchows Arch* 1994; 424(3): 249-56.
34. Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H et al. Expression of the gene of the  $\alpha$ -smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1990; 59: 349-357.
35. Schmitt GA, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinuzoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* 1991; 138: 1233-1242.
36. Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, Komatsu I, Miyazaki A, Watanabe UK. Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology* 1984; 4: 709-714.
37. Aterman K. The parasinusoidal cells of the liver: a historical account. *Histochem* 1986; 18: 279-305.

38. Nakatani K, Seki S, Kawada N, Sakaguchi H, Kawakita N, Yanai A et al. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) on the stellate cells of human liver. *Leiden* 1995; 5: 267-269.
39. Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichorst S, Ramadori G. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver: upregulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Hepatology* 1996; 25: 113.
40. Hautekeete ML, Niki T, Berg K, Delvaux G, Geerts A. A fraction of stellate cells in human liver express glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Hepatology* 1996; 25:112.
41. Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Pathology* 1993; 142(6): 1823-30.
42. Marsden ER, Hu Z, Fujio K, Nakatsukasa H, Thorgeirsson SS, Evarts RP. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab Investigation* 1992; 67(4): 427-33.
43. Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Molecular Biology* 1995; 6(8): 1019-25.
44. Davis BH, Vucic A. The effect of retinol on Ito cell proliferation in vitro. *Hepatology* 1988; 8(4): 788-793.
45. Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244(1): 178-82.
46. Zhang M, Zhang JP, Ji HT, Wang JS, Qian DH. Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21(3): 253-6.
47. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *Biol Chem* 2001.
48. Watanabe S, Hirose M, Wang XE, Ikejima K, Oide H, Kitar T et al. A novel hepatic stellate (Ito) cell-derived protein, epimophin, plays a key role in the late stages of liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(2): 486-90.
49. Ito N, Nemoto M. Über die Kupfferschen Sternzellen und die 'Fettspeicherungszellen' (Fat storing cells) in der Blutcapillarenwand der menschlichen Leber. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1952; 24: 243-258.
50. Wake K. 'Sternzellen' in the liver: Perisinuzoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132: 429-462.
51. Hendriks HFJ, Brouwer A, Knook D. The role of hepatic fat storing (stellate) cells in retinoid metabolism. *Hepatology* 1984; 7: 1368-1371.
52. Reid LM, Fiorino AS, Sigal SH, Brill S, Holst PA. Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology* 1992; 15: 1198-1203.
53. Bronfenmajer S, Schaffner F, Popper H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol Lab Med* 1966; 82: 447-453.
54. Ramadori G. The stellate cell (Ito cell, fat storing cell, lipocyte, perisinuzoidal cell) of the liver. *Virchows Arch (B)* 1991; 61: 147-158.
55. Ahmed Q, Hines JE, Harrison D, Burt AD. Expression of muscle-associated cytoskeletal proteins by human sinuzoidal liver cells. *Leiden* 1991; 4: 203-206.
56. Rudolph R, McClure WJ, Woodward M. Contractile fibroblasts in chronic alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1979; 76: 704-709.
57. Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, Braun L. TGF-beta in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1990; 593: 231-242.

58. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 1558-1562.
59. Zarnegar R, DeFrances M, Michalopoulos GK. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 559-565.
60. Kinoshita T, Hirao S, Matsumoto K, Nakamura T. Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 330-335.
61. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Rev Oncogen* 1992; 3: 27-54.
62. Nagy P, Evarts RP, McMahon JB, Thorgeirsson SS. Role of TGF-beta in normal differentiation and oncogenesis in rat liver. *Mol Carcinog* 1989; 2: 345-354.
63. Michalopoulos GK, Houck KA, Dolan ML, Luetke NC. Control of hepatocyte proliferation by two serum factors. *Cancer Res* 1984; 44: 4414-4419.
64. Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992; 15: 149-155.
65. Berner PF, Frank E, Holtzer H, Somlyo AP. The intermediate filament proteins of rabbit vascular smooth muscle: immunofluorescent studies of desmin and vimentin. *J Muscle Res Cell Motil* 1981; 2: 439.
66. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1988; 56: 45-49.
67. Couvelard A, Scoazec JY, Dauge MC, Bringuier AF, Potet F, Feldman G. Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* 1996; 87: 4568-4580.
68. Bankston PW, Pino RM. The development of the sinusoids of fetal rat liver. Morphology of endothelial cells, Kupffer cells and the transmural migration of blood cells into the sinusoids. *Am J Anat* 1980; 159: 1-15.
69. Enzan H, Kawakami M. Morphological studies on the hepatic hematopoiesis of human fetuses. *Acta Haematol Jap* 1978; 41: 1214-1230.
70. Kan M, Huang J, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B, McKeenan WL. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 7432-7436.
71. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-met. *Oncogene* 1991; 6: 501-504.
72. De Leeuw A, McCarthy S, Geerts A, Knook D. Purified rat liver fat storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology* 1984; 4: 392-403.
73. Schafer S, Zerbe O, Gressner A. The synthesis of proteoglycans in fat storing cells of the rat liver. *Hepatology* 1987; 7: 680-7.
74. Takase S, Led M, Nouch T, Lieber C. Desmin distinguishes cultured fat storing cells from myofibroblasts, smooth muscle cells and fibroblasts in the rat. *J Hepatol* 1988; 6: 267-76.
75. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 219-50.