

40666

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Yıldız ERHAN

**HEPATİT B VİRUSU İLE İLİŞKİLİ KRONİK KARACİĞER
HASTALIKLARINDA DİSPLAZİK DEĞİŞİKLİKLER VE
HÜCRE PROLİFERASYONU**

HÜCRE PROLİFERASYONUNUN ANTI-PCNA İLE GÖSTERİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Gül YÜCE

Dr. Funda YILMAZ

İzmir- 1994

Ödün vermedikleri hekimlik ilkeleri, özverili çalışmaları, yarattıkları hoşgörülü çalışma ortamı, Patoloji'ye yaklaşımları ile bana mesleğimi sevdiren ve öğreten, başta Prof. Dr. Yıldız Erhan olmak üzere Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üye ve yardımcılara, çalışmalarım sırasında ve her konuda büyük desteğini gördüğüm Prof. Dr. Gül Yüce'ye, tez çalışmamdaki kliniko-patolojik işbirliğinin sağlanmasına yardımcı olan Prof. Dr. Yücel Batur ve Dr. Nadir Yönetçi'ye, çalışmamdaki istatistiksel değerlendirmeleri sabır ve ilgiyle yapan Dr. Atilla Erol'a, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum tüm asistan ve uzman arkadaşlarıma, destekleriyle bana hep güç vermiş olan anne ve babama, titiz çalışmaları ve uyumlu çalışma arkadaşlıkları ile çalışmalarına katkıda bulunan tüm laboratuvar ve arşiv görevlilerine, sıcak ilgi ve yardımları nedeniyle idari işler görevlileri ve personelimize teşekkür ederim.

Dr. Funda Yılmaz

KISALTMALAR

- DPA : DNA Polimeraz Alfa
- EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
(Epidermal Growth Factor)
- FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
(Fibroblast Growth Factor)
- HCC : Hepatosellüler Karsinom
- HCV : Hepatit C Virusu
- HBcAg : Hepatitis B Core Antijeni
- HBe Ag : Hepatitis B enfektivite Antijeni
- HBsAg : Hepatitis B Yüzey Antijeni
- HBV : Hepatit B Virusu
- KAH : Kronik Aktif Hepatit
- KAHS : Kronik Aktif Hepatit Sirozu
- PCNA : Prolifere olan Hücre Nükleus Antijeni
(Proliferating Cell Nuclear Antigen)
- TGF-alfa : Transforme edici Büyüme Faktörü Alfa
(Transforming Growth Factor Alpha)
- TGF-beta : Transforme edici Büyüme Faktörü Beta
(Transforming Growth Factor Beta)
- TNF-alfa : Tümör Nekroz Faktörü Alfa
(Tumor Necrosis Factor ALpha)

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	29
BULGULAR	33
TARTIŞMA	53
SONUÇLAR	62
ÖZET	64
KAYNAKLAR	66

GİRİŞ

Viral hepatit, hem akut enfeksiyona hem de kronik hastalık ve sekele neden olabilmesiyle önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bugün viral hepatit olgularının çoğunda birbirinden farklı beş insan virusunun (Hepatit A, B, C, D ve E virusları) etkili olduğu bilinmektedir. Son yıllarda fulminan hepatite neden olan bir Hepatit F virusu ile, olasılıkla keşfedilmeyi bekleyen bir non-B, non-C Hepatit X virusunun varlığı yönünde spekülasyonlar yapılmaktadır.

Kronik hastalığa neden olan B, C ve D virusları içinde, HBV enfeksiyonu tüm evrelerde daha şiddetlidir. Siroza ve sonuçta HCC'a ilerleme, daha sık ve daha erken evrede olmaktadır. Dünya sağlık örgütünün tahminlerine göre, tüm dünyada 2.000 milyon kişi HBV ile enfektedir. Bunlardan 300 milyondan fazlası kronik taşıyıcılarıdır ve bu gruptaki kişilerin %25'i ciddi hastalık geçirme ve sonuçta siroz yada hepatosellüler karsinom ile ölüm riski altındadır. Ayrıca dünya nüfusunun dörtte üçü, bu virusa özgü enfeksiyonun önemli düzeylerde olduğu bölgelerde yaşamaktadır ⁽⁸⁹⁾.

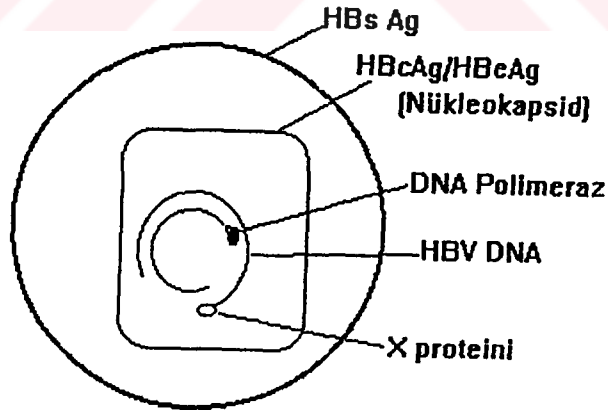
İnsanlık için böylesine önemli olan HBV sorununun çözümüne yönelik çalışmalar başlıca iki ana noktada yoğunlaştırılmıştır; aşılama ve aşılamamanın etkili olamadığı enfekte kişilerin sağaltımı. Bu bağlamda, Dünya Sağlık Örgütü, 1992 yılında HBV aşısının ulusal aşılama programlarına alınmasını önermiştir ama ne yazık ki ülkemizde bu henüz gerçekleştirilememiştir. HBV'na karşı diğer mücadele yöntemi olan kronik vakaların sağaltımında, özellikle İnterferon-alfa umut vericidir. Bazı olgularda siroza ilerlemeyi durdurmaktadır, fakat HCC gelişimini

engelleyip engellemediği henüz bilinmemektedir. Bugün HBV ile ilişkili hastalıklarda, yoğun araştırmalara odak noktası olan konulardan biri de siroza ve HCC'a ilerlemenin önceden belirlenebilmesine yardımcı olabilecek yöntemlerin araştırılmasıdır. Virusun ortaya çıkardığı zedelenmeye yanıt olarak gelişen hücre proliferasyonunun, tümör gelişimine elverişli bir zemin oluşturduğu bilinmektedir. Bu ilerlemede, bir basamak noktası olarak hepatosellüler displazinin bulunduğu ve siroza öncü bir lezyon olduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada da, kronik HBV enfeksiyonu ve bu zeminde gelişen siroz ve HCC olgularında, ışık mikroskobu düzeyinde yardımcı olabilecek bulgulardan rejenerasyon ve hepatosellüler displazi üzerinde yoğunlaşmıştır. Prolifere olan hücre nükleus antijeni'nin (PCNA) immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi ile hücre proliferasyonu araştırılmış ve proliferatif aktivitenin displazik değişiklikler yada kronik hepatit ve sirozun diğer özellikleri ile birliktelik gösterip göstermediği sorgulanmıştır.

GENEL BİLGİLER:

HEPATİT B VİRUSU:

HBV, taksonomik olarak Hepadna virusları (=Hepatitis associated DNA viruses) grubuna dahil edilen bir DNA virusudur. Hepadna virusları küçük, kısmen çift sarmallı sirküler viruslardır. Bu grubun üçü memeli hepatit virusu [İnsan HBV, Kuzey amerika dağ sıçanı (Marmota Monax) HBV, Yer sincabı (spermophilus beecheyi) HBV] ve iki de kuş hepatit virusu (Ördek hepatitis B virusu, Balıkçıl hepatit B virusu) olmak üzere beş üyesi vardır. Tümünde genom büyüklüğü ve yapısı, replikasyon siklusu benzerdir. Tümü hepatotropiktir, taşıyıcılarında patojendir ve konakta kalarak kronik enfeksiyon yaratmaya eğilimlidirler (30).



Şekil-1: HBV'nun yapısı.

HBV içte nükleik asit içeren bir çekirdek (core) ve dışta protein, karbonhidrat ve lipidlerden oluşan bir yüzey kılıfından oluşur.(Şekil 1) HBsAg, bu dış kılıfın içinde bulunur. İnsan serumunda elektron mikroskopik çalışmalarla, üç tip zarflı virus partikülü bulunmuştur (30). Bunlardan tam, enfeksiyöz insan HBV partikülü 42 nm çapındaki

Dane partikülüdür. Diğer partiküller core içermeyen, HBs Ag ve konak hücre kökenli lipidlerden oluşan yuvarlak ve ipliksi partiküllerdir, bunlar immünojeniktir ama enfeksiyöz değildir. HBV enfeksiyonu sırasında, hem enfeksiyöz tam virionlar, hem de çok miktarda enfeksiyöz olmayan partiküller yapılır. Virusun çekirdeğini oluşturan nükleokapsid, HBc Ag ve HBe Ag içerir. HBe Ag'i, HBc Ag'nin bir bütünleyicisidir. Nükleokapsidin içinde ise, viral DNA (HBV genomu) ve DNA polimeraz bulunur. **HBV genomu**, çift sarmallı sirküler bir DNA molekülüdür. Genomun dıştaki uzun sarmalı dört potansiyel gen ve tüm genomik bilgiyi taşır. HBV virusunun genleri ve kodladıkları ürünler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo-1: HBV' nun genleri ve ürünleri.

GEN	KODLADIĞI ÜRÜN
S geni	HBsAg
C geni	HBcAg (HBeAg, bunun yarıklanması sonucu oluşur)
P geni	DNA Polimeraz
X geni	X proteini

Bu genlerden, X geni sadece memeli Hepadna viruslarında bulunur. X proteininin, virusun yaşam siklusu için önemi tam bilinmemekle birlikte virusun replikasyonu için gerekli olmadığı düşünülmektedir. Olasılıkla virus genleri ile konak genlerinin karşılıklı etkileşiminde rol almaktadır (24).

HBV'nun Replikasyonu:

HBV, enfekte bireyde hepatosit içine, hepatosit yüzeyindeki bir reseptöre bağlanarak girer. Virusun yüzeyindeki zarf proteinlerinden pre-S1'in, virusun hücrelere tutunmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir(56).

Hücre içine girince, virusun dış kılıfı kaybolur, DNA' sı serbestleşir ve konak hücrenin nukleusuna girer. Nukleusta, konak hücrenin enzimleri kullanılarak, DNA'nın RNA kopyası çıkarılır. Bu RNA, hem virus proteinleri için mRNA görevi görür, hem de yeni DNA molekülleri yapımı için taslak olarak görev yapar. Nukleusta yapılan viral partiküller sitoplazmaya salınır, sitoplazmada da bir miktar viral partikül sentezi olur. Sonuçta yapılmış olan bu viral partiküller bir araya getirilerek hücre membranından tomurcuklanma yoluyla hücre dışına bırakılırlar. Tomurcuklanma sırasında HBs Ag, konak hücre membranından köken alan proteinler ile sarılarak dolaşıma verilir. HBs Ag' nin kalan kısmı da hem hücreden dışarı verilir, hem de hücrenin endoplazmik retikulumu içine girer. Endoplazmik retikulumdaki bu birikim, hepatositlerde tipik "buzlu cam" görünümüne neden olur. HBV enfeksiyonu sırasında, HBc Ag'i hepatositlerin nukleus ve sitoplazmalarında bulunur ve serumdaki miktarları ölçülemeyecek kadar azdır. Bunun eriyebilir komponenti olan HBe Ag ise, virusun replikasyonu sırasında, tam virionlar ve HBs Ag ile birlikte seruma sekrete edilir. HBV DNA ve DNA polimeraz da, virusun replikasyonu sonunda seruma salınırlar⁽³⁰⁾.

Akut HBV enfeksiyonunda, serumda ilk beliren HBs Ag' dir. Akut veya kronik, aktif HBV enfeksiyonunu belirtir, klinik hastalık sırasında pik yapar ve 3-6 ayda (iyileşme dönemi) tespit edilemeyecek düzeylere iner. Bir süre sonra serumda HBe Ag, HBV DNA ve DNA polimeraz belirir. Bunlar aktif viral replikasyonun ve enfektivitenin sürdüğünü gösterir. HBV enfeksiyonunun bu proliferatif fazında aktif virus replikasyonu vardır ve HBV DNA hepatositlerde epizomal formda bulunur, virionlar ve viral antijenler tam olarak yapılır. Bu fazda zedelenmiş hepatositlerdeki HBs Ag ve HBc Ag'ne karşı sensitize olmuş T lenfositleri karaciğer hasarının bulunduğu bölgelerde izlenir. HBc Ag'i hepatositlerin hem nukleuslarında

hem de membranlarında gösterilebilir. HBe antijeni devam eden virus replikasyonunun göstergesidir. Serumda HBe antijenine karşı gelişen antikorların (Anti-HBe) belirmesi virus replikasyonunun sonlandığını gösterir. HBV-DNA'nın serumdan kaybolması bugün virus replikasyonunun durduğunu belirleyen en değerli kriter olarak kabul edilmektedir⁽⁵⁶⁾.

Virusun yaşam siklusunda proliferasyon fazını, entegrasyon fazı izler. Bu fazda virionlar artık yapılmaz. Virus, karaciğerden yok edilemez ve persiste olursa, virus DNA'sı konak hücrenin genomu içine yerleşir. Antijenlerin ve T hücrelerine karşı antijenik çekiciliğin ortadan kalkması ile ve antijenlere karşı yapılan antikorların belirmesi ile enfektivite sona erer, aktif karaciğer hasarı yatışır. HBe Ag ve HBV DNA'nın bu dönemde serumdan kaybolmayıp devam etmesi, süregelen aktif virus replikasyonunun göstergesidir ve hastalığın kronikleşeceğini gösterir.

HBV ile enfekte olan erişkinlerin çoğu asemptomatik yada semptomatik akut hepatit geçirirler. Hastaların büyük kısmı altı ay içinde iyileşirken az bir kısmında öldürücü fulminan enfeksiyon gelişir. Erişkin olguların % 10'unda ve neonatal dönemde enfekte olanların % 90'ında kronik taşıyıcılık durumu ortaya çıkar. Bu evreden sonra hastalığın gidişi ve klinik yansımaları oldukça değişkendir. Bazı kişilerde, aktif viral replikasyon yoktur, asemptomatik bir seyir izlenir ve karaciğer fonksiyonları normaldir (asemptomatik taşıyıcılık durumu). Bazılarında ise semptomlar ve virus replikasyonu sürer, enfeksiyon kronik hepatit, kronik aktif hepatit sirozu ve bu üç durumdan herhangi birinin zemininde gelişen HCC ile seyrini sürdürebilir.

KRONİK AKTİF HEPATİT:

HBV enfeksiyonunda iyileşme, hastanın interferon ve immun sistemlerinin birlikte ve aktif olarak çalışmasına bağlıdır. HBV'nun kendisi sitopatojen değildir ve virusun eliminasyonu enfekte hepatositlerin immunolojik olarak eritilmesine bağlıdır. Viral antijenlere karşı antikor gelişirken, hepatosit membran proteinlerine karşı da otoantikorlar gelişir ve virus taşıyan hücreler yanısıra bir miktar normal hepatosit ölümüne de neden olurlar. Interferon ve immun sistemde bozukluk bulunan kişilerden hastalığın kronikleştiği düşünülmektedir (56).

HBV'nun ortadan kaldırılması öncelikle sitotoksik T- lenfositlerince (T_c) ve doğal öldürücü (NK) hücrelerce gerçekleştirilir. Sitotoksik T- lenfositleri yardımcı (T_H) ve baskılayıcı (T_s) T lenfositlerinin etkisi altındadır ve yüzeylerinde Ana Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) sınıf I proteinleri ile birlikte HBV antijenleri bulunduran hepatositleri tanır ve parçalarlar.

MHC sınıf I proteinleri bu tanımanın gerçekleşmesi için esastır. Normalde hepatosit yüzeyinde eser miktarda MHC sınıf I proteini bulunur. Interferonlar, hepatosit yüzeyinde MHC sınıf I proteini bulunuşunu arttırarak, enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfositlerince tanınması ve yok edilmesini kolaylaştırırlar. Konağın hücresel immun yanıtının uyarılmasında, HBe Ag ve HBc Ag en önemli hedeflerdir. Eğer interferon sisteminde bir bozukluk varsa, hepatosit yüzeyinde MHC sınıf I proteinleri yeterince gösterilemeyeceği için gelişen immun yanıt da yetersiz olacaktır. Tüm enfekte olmuş hepatositler ortadan kaldırılamadığı sürece olay süregelen virus replikasyonu ve buna karşı gelişen aralıklı immun yanıt atakları ile sürecektir. Virus altı ay içinde elimine edilmediği ve karaciğer hasarı yatışmadığı zaman olay kronik hepatit olarak adlandırılmaktadır.

KRONİK HEPATİTTE PATOLOJİK ÖZELLİKLER:

Kronik hepatitte, herhangi bir kronik inflamasyonda olduğu gibi hücre hasarı, buna eşlik eden rejenerasyon ve onarım bulunmaktadır. Rejenerasyon ve onarım süreci sonuçta daha saldırgan bir kronik hepatite ve bir süre sonra da siroza dönüşüme neden olabilir.

Kronik enflamasyon ve bunun komponentlerinin (hücre hasarı, rejenerasyon, yangısal infiltrasyon ve onarım) şiddeti zaman içerisinde değişiklikler göstermektedir. Kronik hepatitin şiddetini histopatolojik olarak değerlendirebilmek amacıyla kronik hepatiti; kronik persistan hepatit (KPH), kronik lobüler hepatit (KLH) ve kronik aktif hepatit (KAH) olarak üç kategoriye ayırma yoluna gidilmiştir. Bunlardan KPH'te ve KLH'te karaciğerin normal yapısı korunmuştur, ilkinde portal alanlarda, ikincisinde ise lobül içinde minimal bulgu mevcuttur ve portal alanları çevreleyen sınırlayıcı plakada piecemeal nekrozu ile erozyon bulunmamaktadır. Her ikisinde de siroza geçiş gözlenmez fakat KPH'ten kronik aktif hepatite geçiş olabilir.

KAH, kronik hepatitin en ciddi ve en kötü prognozlu formudur. Histolojik olarak KAH tablosu; mezankimal reaksiyon, piecemeal nekrozu, parankim dejenerasyonu, parankim rejenerasyonu ve safra kanalı lezyonlarından oluşur. Karaciğerin normal lobül yapısı bozulmuştur, lezyon uniform değildir.

Mezankimal reaksiyonu, lenfositler ve az sayıda plazma hücreleri ile makrofajlardan oluşan yangısal bir infiltrasyon, Kupffer hücre hiperplazisi ve fibroblastik aktivitede artış oluşturur. Yangısal hücre infiltrasyonunun yoğunluğu değişkendir, esas olarak portal ve periportal alanlar ile yeni oluşan fibröz köprülerde odaklanır ve buralardan parankime uzanır. Lenfositler ve plazma hücrelerinin sinüzoidleri yaygın olarak infiltre etmesi aktivitenin bir göstergesidir. Hepatositlerin ortadan kalktığı yada

parçalandığı alanlar kısa bir süre lenfosit, Kupffer hücresi ve tek tük plazma hücrelerinin oluşturduğu küçük hücre birikimleri ile belirlenirler (fokal nekroz odakları).

KAH' in patolojisine hakim olan bulgu **piecemeal nekrozudur**. Bu, yangısal hücrelerin ve parankimi ortadan kaldıran fibroblastik aktivitenin bir bileşimidir. Portal alanlar ve fibröz septumların parankimle karşı karşıya olduğu bölgelerde, lenfositler küçük hepatosit gruplarını yada tek tek hepatositleri çevreler. Sonuçta bu, portal alanlarda hafif genişlemeden belirgin siroza dek değişebilen yapısal bozukluğa yol açacaktır. Tüm karaciğer boyunca düzensiz dağılım gösterir ve yoğunluğu değişkendir.

Parankim dejenerasyonu, virusa karşı gelişen immün yanıtla bağlı olarak ortaya çıkan hepatosit hasarıdır. Hepatositlerde, asidofil ve balon dejenerasyon görülebilir. HBV enfeksiyonuna özgü olan sitoplazmada "buzlu cam görünümü" ile nukleuslarda "kumlu nüve" görünümü izlenebilir. Buzlu cam hücreleri, normale göre daha büyükçe, soluk eozinofilik sitoplazmalarıyla dondurulmuş camın görünümüne benzetilen hepatositlerdir ve sitoplazmadaki bu görünüm proliferen olan düz endoplazmik retikulum arasında bulunan HBsAg tubulleri nedeniyle ortaya çıkar. Kumlu nüve (sanded nuclei) ise HBcAg içeren düzensiz şekilli, soluk boyanan intranükleer inklüzyonlardır. HBV enfeksiyonunda sık görülmekle birlikte Diabetes Mellitus gibi metabolik hastalıklarda da benzer bir nukleus görünümü izlenebilir.

Viral antijen taşıyan hücrelere yönelmiş immün yanıt hepatositlerde lizise neden olur. Bu hücre erimesi yaygın hale gelebilir ve köprüleşme nekrozları oluşabilir. Kollabe olmuş bir retikulum kuşağı (pasif septum), portal alandan veya anormal bir fibröz çıkıntıdan parankime, bir efferent vene doğru uzanır. Başlangıçta bu retikulum lifleri hafifçe ayrılabilir fakat piecemeal nekrozu ve bunun aktif fibrozisinin varlığında, bunlar hızla

kollagene dönüşürler (aktif septum). Bu nekroz köprülerinin, karaciğer boyunca piecemeal nekrozunun daha hızlı yayılmasını kolaylaştırdığı ve varlığının kötü prognozla birlikte olduğuna inanılmaktadır⁽⁴³⁾.

Parankim rejenerasyonu, oluşan karaciğer hasarına karşılık olarak zedelenmemiş parankim alanlarındaki hepatositlerin rejenerasyonudur. Rejenerasyonun morfolojik bulguları; karaciğer hücre kordonlarının kalınlaşması ve birden fazla hepatosit içermesi ile sitolojik değişikliklerdir. Düzenli şekilde anastomoz yapan ve radial düzen gösteren kordonların yerine rastgele düzenlenen kordonlar görülür. Rejenere olan hepatositler hücre kordonlarında kalınlaşma ve düzensizlik yanısıra rozetler de oluşturabilir. Rozet oluşumu genellikle portal alanlara komşu bölgelerde meydana gelir. Rozetler ortada bir lümen halinde izlenebilen bir safra kanalikülü etrafında çevrelenen dört ila sekiz hepatositin oluşturduğu küçük gruplardır. Bu rozetleri, ince fibröz bir bant çevreler ve bunu komşu parankimden ayırır. Eğer rejenerasyon yeniyse, hepatositlerde lipofüsin bulunmaz. Sitolojik değişiklikler binükleer ve multinükleer hepatositlerin sayısında artış, nükleer hiperkromazi ve nükleer polimorfizmdir. Hem multinükleer hepatositler, hem de büyümüş hiperkromatik nukleuslar multiploidiyi temsil eder. Nukleus büyüklükleri de ploidi derecesine karşılık olarak değişkenlik göstermeye başlar.

KAH'te, hiperkromatik ve düzensiz şekilli nukleuslar, sitoplazma ve nukleusta normale oranla irileşme ile karakterli hücre gruplarının ortaya çıkışı şeklinde tanımlanan ve **hepatosellüler displazi** olarak isimlendirilen değişiklikler de görülür. Displazik hücreler diğer nedenlere bağlı KAH'lerde de görülmekle birlikte en çok HBV'a bağlı kronik karaciğer hastalıklarında izlenir. Hepatosellüler displazi ileride daha ayrıntılı olarak incelenecektir.

KRONİK AKTİF HEPATİT SİROZU:

Siroz, birçok hastalığın farklı yollardan geçerek ulaştığı bir son dönem karaciğer hastalığıdır. Bu tablonun temelinde birbirinden farklı birçok hastalık durumundan biri bulunabilir. HBV enfeksiyonuna bağlı KAHS Afrika ve Güneydoğu Asya'da siktir, gelişmiş ülkelerde ise sirozun en yaygın nedeni alkolik karaciğer hastalığıdır (57).

Altta yatan etyolojik faktör ne olursa olsun, sirozun üç önemli tanımlayıcı özelliği *i)* tüm karaciğerin **diffüz** olarak tutulması, *ii)* **fibrozis** gelişimi, *iii)* **nodüllerin** varlığıdır.

Siroz genellikle yıllarca süren uzun bir periyod boyunca yavaşça gelişir ve gelişimi için etyolojik faktörün düzenli ve sabit uyarımı gereklidir. Bu stimulus düzenli olarak hepatosit hasarı ve ölümüne yol açar ve buna karşılık olarak da rejenerasyon ve onarımın klasik mekanizmaları harekete geçer. Hepatosit zedelenmesi ve kaybı geliştikten sonra zedelenme bölgesinde Kupffer hücreleri ve İto hücrelerinin uyarımı ile fibrozis, zedelenmeye komşu hepatositlerin yanıtı ile de rejenerasyon başlar.

Fibrozis, doku zedelenmesinin en belirgin olduğu alanlarda en önce başlar. Fibrozisin gelişiminde birbiriyle etkileşim halinde olan üç temel faktör vardır; *i)* İto hücrelerinin aktivasyonu; *ii)* ekstrasellüler matriks sentezinin artması; *iii)* ekstrasellüler matriksin bileşiminin değişimi.

İto hücreleri, zedelenmiş karaciğerdeki Kupffer hücrelerinden açığa çıkan Kupffer hücre faktörleri (TGF beta, TGF alfa, İnterlökin 1, TNF alfa) ile yerel eriyebilir faktörlerin etkisi altında aktive olurlar. Aktive olmuş İto hücreleri, kollagen ve diğer ekstrasellüler matriks maddelerinin sentezinden birinci derecede sorumlu olan hücrelerdir. Etyolojisi ne olursa olsun sirozda total karaciğer kollajeni, organın her bir gramında altı kat

artış gösterir. Bu total kollagen artışı, Tip I ve III kollagende orantısız bir artışla birlikte, diğer bir deyişle ekstrasellüler matriksin bileşimi de değişmiştir. Bu kollagenler fibröz septumların büyük bir kısmını oluşturur ve subendotelyal alanda ince dantel şeklindeki bazal membran benzeri materyalin yerine geçerek, yoğun intersitisyel bir matrikse dönüştürür. Laminin ve fibronektin de subendotelyal aralıkta artar. Patolojik matriks birikimi, asinus içinde hücre zedelenmesi ve inflamasyonun en fazla olduğu yerlerde en erken görüldüğünden, HBV enfeksiyonunda fibrozis portal alanların çevresinden başlar.

KAHS'da MORFOLOJİK BULGULAR:

Histopatolojik bulgular yukarıda tanımlanan fibrozis, nodül oluşumu ve rejenerasyon üçlüsünün ortaya çıkardığı görüntülerdir. Bunlara kronik hepatitte izlenen buzlu cam hücresi, kumlu nüve görünümü gibi virusa özgü değişiklikler ile aktif yangısal yanıtın komponentleri de (fokal nekrozlar, piecemeal nekrozu, portal enflamasyon) değişik derecelerde eşlik eder. KAHS başarılı bir şekilde tedavi edilirse yada spontan remisyon gelişirse enflamasyon çözülür fakat siroz kalır. Bu bazen inaktif siroz olarak isimlendirilir ve aktif enflamasyon görülmediği için sirozun diğer nedenlerinden ayırd edilmeyebilir.

Nodül yapıları açısından değerlendirildiğinde HBV'na bağlı KAHS, daha çok, nodül çapının 3 mm'den fazla olduğu makronodüler tiptedir. Nodüllerin büyüklükleri birbirinden farklıdır ve nodülleri çevreleyen fibröz bantların kalınlıkları da değişkendir. Karaciğerin normal şekli bozulmuştur. HBV enfeksiyonunda, geniş alanlarda parankim kollapsı olduğu için ortaya çıkan siroz genellikle makronodüler tiptedir⁽⁵⁷⁾.

Nodüllerin çapının 3 mm'den az olması ve nodülleri birbirinden ayıran septumların kalınlıklarının üniform oluşu ile karakterli mikronodüler siroz HBV enfeksiyonunda çok nadiren gelişir⁽⁵⁷⁾.

Morfolojik olarak **rejenerasyon bulguları**, daha önce kronik hepatitte tanımlanmış olanlar rejenerasyon bulgularından farklı değildir. Karaciğer hücre kordonlarının kalınlaşması aktif rejenerasyonu gösterir. Hücre kordonlarında büyüme hızı farklılık göstereceği için, bazı hücre kordonları daha hızlı gelişenlerce basıya uğratılır. Sirozdaki parankim rejenerasyonunun çok karakteristik bir özelliği, birbirine komşu hepatosit gruplarının farklı hızlarda büyümesi ve farklı hücre ve nukleus özellikleri taşımalarıdır. Hızlı büyüyenler daha geniş, sıkışanlar daha dar hücrelerdir. Hücre kordonlarının kalınlığı ikiye katlandıkça, nodül önceden varolan parankimden bölünmüş bir parça halindeyken, rejeneratif bir nodüle dönüşür.

Nodülün büyümesi, hücre ölümü ve rejenerasyon hızı arasındaki orana bağlıdır. Bir nodülde hücre ölümü rejeneratif aktiviteye eşit olabilir yada onu geçebilir yada tam tersine rejenerasyon hücre ölümünden fazla olabilir. Eğer genelde hücre ölümü rejenerasyondan daha fazlaysa klinik bulgular belirginleşir. Tek tek nodüller içinde hücre ölümü ve rejenerasyon arasında bir denge genellikle tanınmaz. Eğer rejeneratif aktivite, hepatosit kaybını kompanse etmekten öteye gider ve fazla olursa, nodül büyür ve bunu çevreleyen fibröz doku kompresyona uğrar.

KARACİĞER HÜCRE DİSPLAZİSİ:

Karaciğer hücre displazisi, makrorejeneratif nodüllerle (Adenomatöz hiperplastik nodül) birlikte hepatosellüler karsinoma öncülük eden lezyonlar olarak kabul edilmektedir⁽¹⁸⁾.

Hepatosellüler displazi ilk kez 1973'te, premalign bir lezyon olarak tanımlanmıştır⁽⁴⁾. Displastik hepatositler, normale oranla büyümüş, pleomorfik nukleuslu, kromatini kümelenmiş, nukleus membranları

kalınlaşmış ve nukleolusları belirginleşmiş hücrelerdir. Nukleuslar tipik olarak normalin iki katından fazla büyüklüktedir, nukleus çeperleri, normal hepatositin düzgün yuvarlak profilinden farklı olarak düzensiz ve köşeli olabilir. Sitoplazma normal hepatosit sitoplazmasından geniştir^(4,69,70). Multinükleasyon, nukleolus sayısında artış ve intranükleer sitoplazmik inklüzyonlar görülebilir.

Displazi, alkolik ve kriptojenik sirozda, otoimmün hastalıklarda da bulunabilir, fakat HBV ile displazi arasında sıkı bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir⁽¹⁸⁾. Displastik karaciğer hücreleri, normal karaciğerin sadece küçük bir bölümünde (%1) saptanırken, sirotik karaciğerlerin % 20-40'ında ve siroza hepatosellüler karsinomun eşlik ettiği olguların %64- 80'inde saptanmaktadır ^(4,16,48). Siroz ve hepatosellüler karsinomun eşlik etmediği kronik HBV enfeksiyonu olgularında, karaciğer biyopsilerinde %20 oranında karaciğer hücre displazisi bildirilmektedir^(2,68,69).

Hepatosellüler displazide gözlenen nukleus aberasyonlarının derecesi ve dağılımı değişkendir. Atipinin şiddetine dayanarak, düşük ve yüksek dereceli displazi ayırımı yapılabilir. Bu ayırımın biyolojik veya prognostik önemi olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Olguların çoğunda displastik hücreler küçük, çevreden belli belirsiz ayırt edilen odaklar halindedir ama siroz nodüllerinin tümünü kaplayabileceği gibi tek tek hücreler şeklinde de olabilir. Bazı araştırmacılar, displastik odakların ve her bir odaktaki displastik hücrelerin sayısını temel alan bir derecelendirmeye göre, orta derecede veya şiddetli olarak tanımladıkları lezyonları displazi için diagnostik kabul etmektedirler⁽¹⁶⁾. Bu tip kantitatif değerlendirmelerin önemi ve hepatosellüler displazinin neoplastik özelliği konusunda henüz kesin bir fikir birliği bulunmamaktadır.^(18,88).

HEPATOSELLÜLER KARSİNOM:

HCC, en sık görülen malign karaciğer tümörüdür, primer karaciğer malignitelerinin yaklaşık % 80'ini oluşturur. HCC'un çarpıcı özelliklerinden biri, görülme sıklığının coğrafik değişiklikler göstermesidir. Kuzey Amerika ve Batı Avrupa' da, yıllık insidansının 100.000 nüfusta dört ila beş, Güneydoğu Asya ve Afrika'nın bazı bölgelerinde ise, 100.000 nüfusta 100'ün üzerinde olduğu bildirilmektedir (24,57).

Bu epidemiyolojik değişkenliğin, etyolojik ve patogenetik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar HCC gelişme riskini arttıran birçok faktör ve hastalığın varlığını göstermiştir. Kronik karaciğer zedelenmesi ile birlikte olan birçok hastalık HCC'a predispozisyon yaratabilmektedir. Bu faktörler içinde, HCC gelişimi ile arasındaki ilişki en iyi ortaya konmuş olan HBV enfeksiyonudur. Birçok epidemiyolojik çalışmada, HCC' un yaygın olduğu bölgelerle, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler arasında coğrafik uyum gösterilmiştir (91). HCC insidansının yüksek olduğu bölgelerde HBV' na bağlı, genellikle prenatal geçişle kazanılan kronik karaciğer hastalığı en önemli predispozan faktör iken, HCC insidansının düşük olduğu gelişmiş ülkelerde alkole bağlı siroz önde gelen faktörlerdendir(52,57,71,77,72,91). Bununla birlikte, son zamanlarda HBsAg negatif HCC olgularında, polimeraz zincir reaksiyonu gibi daha duyarlı yöntemlerin kullanımıyla, ABD'de patogenezi bilinmeyen HCC olgularının büyük kısmından HCV ve/veya okült HBV enfeksiyonunun sorumlu olduğu gösterilmiştir(59). Tümörün görüldüğü yaş dönemleri ve her iki cinsteki dağılımı da, etyolojik faktörlerden etkilenmektedir; HBV enfeksiyonu zemininde gelişen HCC'da, erkek/ kadın oranı 3:1 ile 6:1 arasında değişmekte iken, normal karaciğer zemininde gelişen HCC cins ayrımı gözetmez (91). İnsidansının düşük

olduğu bölgelerde tümör 6. yada 7. dekatta, yüksek olduğu bölgelerde ise 3. yada 4. dekatta daha sıktır.

HCC' da MİKROSKOPİK ÖZELLİKLER:

HCC'da tümör hücrelerinin hücresel ve yapısal özelliklerinin normal hepatositlere benzemesi tanıda en önemli özelliktir. Tümör hücreleri komşu neoplastik olmayan hepatositlerden daha büyük veya küçük olabilir. Hücreler genellikle poligonal şekillidir, belirgin hücre membranları seçilebilir, normal hepatositlere göre nukleus/sitoplazma oranı artmıştır. Sitoplazmaları geniş, ince granüler ve eozinofiliktir, nukleuslar kaba kromatin dağılımı gösterir ve yuvarlaktır. Nukleoluslar genellikle belirgindir.

HCC'un mikroskopik görünümü olgudan olguya değişkenlik gösterebileceği gibi, tek bir olgunun farklı alanları arasında da değişkenlikler olabilir. Bunun nedeni tümörün gösterdiği farklı histolojik gelişim modelleridir. Trabeküler, solid, psödoglandüler, pelioid, dev hücreli, iç hücreli, berrak hücreli, fibrolamellar ve sklerozan olarak tanımlanan bu modeller HCC'un morfolojik spektrumunun bilinmesi ve tanınması açısından önemli olmakla birlikte fibrolamellar varyant dışında hiçbirinin prognostik önemi yoktur (33).

HBV ve HEPATOKARSİNOGENESİS:

Kronik HBV enfeksiyonu ve HCC gelişimi arasındaki ilişki, ilk kez kronik hepatit, siroz ve HCC'u içeren bir grup hastada, serumda Hepatitis B Yüzey antijeninin gösterilmesi ile ortaya konmuştur(76). Bu veriler, HCC ve HBV enfeksiyonu arasındaki bağlantıyı gösteren çok sayıda çalışma ile doğrulanmıştır (14,23,24,26,29,39,41). HCC insidansının yüksek olduğu bölgelerde, olguların % 90'ı Hepatit B pozitifliği ile birlikte. Kronik B

virüsü taşıyıcılarında, HCC gelişme riski enfekte olmamış bireylere göre 200 kez fazladır (57). Genellikle 20 yılı aşan uzun bir premalign dönem tümör gelişimi için gereklidir.

Hepadnavirüsleri, tümör oluşumu ile doğrudan ilişkinin varlığının gösterildiği nadir virüslere aittir. Tüm memeli hepadna virüslerinin (Dağ sıçanı HBV, Yer sincabı HBV, insan HBV) neden olduğu kronik hepatitlerin HCC'a sıklıkla yol açtığı, kontrollü deneyler ve prospektif epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Bunların arasında, en güçlü tümör indükleyici dağ faresi hepatit B virüsüdür. Kanserojen madde içermeyen diyetle beslenmiş tüm kronik dağ sıçanı hepatit virüsü taşıyıcılarında, deneysel enfeksiyondan 3 yıl sonra tek veya multipl HCC gelişimi gösterilmiştir (72). Dağ sıçanı hepatit virüsüne bağlı kanser gelişiminde birbirinden ayrı premalign evreler tanımlanmıştır ve bunlar farelerde kimyasal kanserojenlere bağlı olarak oluşan karsinogeneze çarpıcı bir şekilde benzerlik göstermektedirler . Yer sincabı hepatit B virüsü ve insan HBV enfeksiyonunda HCC gelişimi sıklığı daha düşüktür.

Hepadna virüslerinin güçlü karsinojenik potansiyellerinin, bu virüslerin üç özelliği ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir; i) bu virüslerin konak hücre genomuna entegre olmaları; ii) hücresel promotorleri transaktive eden polipeptidleri taşımaları; ve iii) kronik hepatite neden olma kapasiteleri.

Hem HBV'nun eşlik ettiği insan HCC olgularına, hem de hepadnavirüsleri ile enfekte edilen deneysel modellere ait veriler, virus DNA'sının konak hücre genomuna bağlanmasının malign transformasyon için gerekli bir ön koşul olduğunu göstermektedir(14,23,39,41,57,71,72). Kronik HBV taşıyıcılarında gelişen HCC olgularının %80-100'ünde, HBV DNA'nın entegrasyonu bildirilmektedir (91). Entegre olmuş virus DNA'sının, tümöre komşu, malign olmayan hepatositlerde ve hücresel atipi alanlarında da

gösterilmesi, virus integrasyonunun tümör gelişimine öncülük ettiğini düşündürmektedir⁽⁷⁵⁾.

Son yıllarda, kronik HBV enfeksiyonu zemininde tümör gelişiminde üç olası mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birincisi; kronik enflamasyonun rastlantısal mutasyonlar ve viral entegrasyonlara neden olması; ikincisi entegre olan virus genlerinin, konak hücre genlerinde değişikliğe neden olması; üçüncüsü de, virus genleri ve gen ürünlerinin doğrudan onkojenik etkiyle tümöre neden olmasını içermektedir.

1- Rastlantısal mutasyonlara ve rastgele viral entegrasyonlara neden olan kronik enflamasyonu temel alan mekanizmaya göre; kronik viral enfeksiyonun, kronik hepatiti başlatmasıyla, HBV enfeksiyonuna özgü olmayan, sürekli hücre ölümü ve rejenerasyonunu içeren, genel bir mutasyon oluşturunca mekanizma çalıştırılmaktadır. Hücreler rejenerere ve proliferere oldukça, hepatosit ve virus genomunda rastgele mutasyonlar olduğu ve malign dönüşümün gerçekleştiğine inanılmaktadır. Etyolojik ajanın bu modeldeki rolü (ör HBV, alkol), konak immün yanıtını stimule etmek ve hepatosit nekrozunu başlatmaktır. HCC gelişen HBs Ag pozitif hastaların %60-90'ında siroz da bulunduğu için, sirozun kendisi de tümör gelişiminde bir kofaktör olarak kabul edilmektedir⁽⁹¹⁾.

Bu mekanizma, HBV enfeksiyonu dışındaki kronik karaciğer hastalıklarında HCC gelişimini kısmen açıklamakla birlikte HBV' nun eşlik ettiği HCC olguları için yetersiz kalmaktadır. Birincisi, virus DNA'sının konak hücre genomuna entegre olması için enfeksiyonun kronikleşmiş olmasının gerekip gerekmediği açık değildir. HBV DNA konak hücre genomuna, enfeksiyonun çok erken evrelerinde entegre olabilir. Deneysel HBV enfeksiyonundan sonra, fetal hepatosit kültürlerinde 5. günde entegrasyonlar saptanmıştır⁽⁷²⁾. İkincisi, başlangıçta hepadna viruslarının entegrasyonunun spesifik kromozom bölgeleri yada spesifik hücresel

genler için seçicilik göstermediği ve rastgele olduğu düşünülmüşse de, son zamanlarda virus entegrasyonunun ve konak hücrede gelişen mutasyonların rastgele olmadığını gösteren veriler elde edilmiştir. Entegrasyonların konak hücrede 11. ve 17. kromozomlarda daha sık olduğu bildirilmektedir (57,72). Önceleri hücre genomu içine yerleşen virus genomu bölgesinin de herhangi bir genom parçası olduğu düşünülürken, son zamanlarda, virus genomunun bazı bölgelerinin (pre-S bölgesini, HBs Ag'ni, X geni ürününü ve HBc Ag'ni kodlayan genler) tercihan entegre olduğu saptanmıştır.

2- Entegre olmuş virus genleri tarafından, konak hücre genlerinin ekspresyonunun doğrudan düzenlenmesini içeren mekanizma:

Bu mekanizma virusa daha aktif bir rol ön görmektedir. Burada virusun düzenleyici genlerinin, konak hücre genomunda spesifik bölgelerin komşuluğunda yerleşerek, konak hücre genlerinde değişikliğe neden olduğu öne sürülmektedir. Konak hücre genlerindeki değişiklik, ya konak hücredeki protoonkogenlerin ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi, yada tümör gelişimini baskılayıcı (süpressor) genlerin etkisinin ortadan kalkması şeklinde olabilir. Teorik olarak, konak protoonkogenlerinin ve konak tümör gelişimini baskılayıcı genlerinin, HBV tarafından yeniden düzenlenmesi için; i) virus genomunun spesifik bölümlerinin, bu konak genlerine komşu olan spesifik bölgelere seçici olarak entegre olması, diğer bir deyişle entegrasyonların rastgele değil de selektif olması; ii) bu hücre genlerinin ekspresyonunun entegrasyon ve hücre transformasyon sırasında değişmesi gerekmektedir.

Hem deneysel modellerde, hem de insan tümörlerinde yapılan çalışmalar entegrasyonların rastgele olmayabileceğini göstermektedir. Konak hücreye virus genomunun belirli bölgeleri özellikle entegre olmaktadır ve virusun yerleşimi konağın düzenleyici genlerini hedef alabilmektedir.

İnsan HCC'lerinde, Hbs Ag geni sıklıkla entegre olmuş haldedir. Yine, hepadna virus entegrasyonlarının çoğunda, X proteini değişikliğe uğramış halde fakat transaktive edici özelliğini koruyarak bulunmaktadır. X geni aktarılan hepatositlerde tümüyle malign klonların ortaya çıkışı, HBV X geni taşıyan transgenic farelerde de HCC gelişimi gösterilmiştir^(51,73). HCC'lu çocuklarda, HBx geni ve HBs geni entegrasyonunun sık olduğu bildirilmektedir⁽¹³⁾.

Virusun konak hücreye entegrasyonu ve konak hücrede oluşan malign dönüşüm sırasında, konak hücre genlerinin ekspresyonunun değiştiğine ilişkin veriler de bulunmaktadır. Konak hücre genleri ile ilgili değişikliklere ait veriler esas olarak, hücrede protoonkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve büyüme faktörlerinin aşırı ya da yeniden ekspresyonu ile ilgilidir.

Protoonkogenler, viral transforme edici proteinlerin hücresel karşılıklarıdır, sinyal aktarımı, replikasyon ve transkripsiyon gibi kritik hücresel olaylarda anahtar proteinler olarak davranırlar. Kalitatif (mutasyon, yeniden düzenlenme) veya kantitatif (amplifikasyon, aşırı ekspresyon) değişikliklerle transforme edici potansiyel kazanırlar. Spontan ve kimyasal olarak başlatılan kemirici hepatokarsinogenezinde, bazı protoonkogenlerin aktive olduğu (sıklıkla Ras ailesinin üyelerinin), bazı protoonkojenlerin ekspresyonun ise değiştiği (c-myc, c-raf, c-yes, c-fos, erb-B) gösterilmiştir⁽⁷²⁾. Dağ sincabı HBV'na bağlı hepatokarsinogenezde, hücre büyümesi ve neoplastik dönüşümü düzenleyen bir konak geni olan N-myc 2 aktivasyonu sık bildirilmektedir^(72,91). İnsan HCC'lerinde az sayıda tümörde N-ras ve Ha-Ras genlerinin aktivasyonu gösterilmiştir^(63,72). Dağ sıçanı modelinin insan enfeksiyonu ile karşılaştırılıp karşılaştırılmıyacağı henüz bilinmemektedir, çünkü bu

modelde tümör, enfeksiyonun çok erken bir evresinde gelişmekte ve kronik enfeksiyonu olan hayvanların tümünde ortaya çıkmaktadır.

İnsan tümörlerinde, hücrel onkogenlerin komşuluğunda HBV entegrasyonu gösterilmiştir. Hücre büyümesini düzenleyen bir gen olan, retinoik asit reseptörü geninde HBV DNA entegrasyonu gösterilmiştir⁽⁵⁾. Yine bazı insan HCC'lerinde, Epidermal Büyüme Faktörü reseptöründe ve c-myc geninde aktivasyon gösterilmiştir⁽⁷²⁾.

Bu bulgular henüz parça parça olmakla birlikte, insan karaciğer karsinogenezinde, transforme edici genlerin aktivasyonunun yer aldığını ve genelde kemirici hepatokarsinogenezinde yer alan gen ailelerinin katıldığını göstermektedir.

HBV entegrasyonlarının, tümör gelişimini baskılayıcı genleri devre dışı bırakmalarına ilişkin hipotez de oldukça çarpıcıdır. 17. kromozom içine, p53 geninin yerleştiği bölgenin civarına HBV entegrasyonları tanımlanmıştır⁽⁷⁹⁾. Hem HCC hücre kültürlerinde, hem de Güney Afrika ve Çin'de HBV ile ilişkili tümörlerde p53 geninde spesifik mutasyonlar gösterilmiştir^(10,40). Hücre siklusunda kritik önemi olan genlerin HBV entegrasyonu ile değişmesi, replikasyonda deregulasyona ve HCC gelişimine yol açabilir.

3- Virus genleri ve gen ürünlerinin doğrudan onkojenik etkisi:

Transgenik farelerle yapılan bazı çalışmalarda HBV DNA'nın doğrudan onkojenik etkisini destekleyen veriler elde edildiği bildirilmişse de, bilinen hücrel yada viral onkogenlerin hiçbiri ile HBV DNA arasında benzerlik gösterilemediği ve ayrıca, onkogen içeren hiçbir hepadna virus genomu saptanmadığı için, virusun doğrudan onkojenik olduğu kanıtlanamamıştır. Eğer dominant bir viral onkogen hücrel dönüşümden sorumlu olsaydı, HCC için tipik olan 20-30 yıllık bir premalign periyoddan çok daha kısa bir sürede kanser gelişimi olması beklenirdi.

Yukarıda tanımlanan modellerin hiçbiri tümüyle dışlayıcı değildir ve farklı koşullarda, farklı tümörlerin gelişimini açıklıyor olabilir. HBV ile ilişkili tümörlerin gelişiminde olası senaryo şudur; kronik enfeksiyon sürekli hepatosit hasarı, düzensiz rejenerasyon ve virusun integrasyonuna neden olmaktadır. Düzensiz hepatosit rejenerasyonu ve virusun integrasyonu, olasılıkla sinerjik etki göstererek, ya doğrudan viral onkogenlerin yapımı yoluyla yada indirekt olarak hücrel onkogenlerin düzenlenmesiyle malign transformasyonu indüklemektedir. Bazı tümörlerde hücrel onkogenlerin ekspresyonunda artış gösterilmiş olmakla birlikte, bu mekanizmanın tüm tümörler için geçerli olup olmadığı tartışmalıdır.

HÜCRE PROLİFERASYONU VE PROLİFERE OLAN HÜCRE NUKLEUS ANTİJENİ:

Tam olarak gelişmiş bir organizmada diferansiyel olmuş hücreler proliferasyon kapasitesi açısından değerlendirildiğinde labil (sürekli yenilenen), stabil (duruma bağlı olarak yenilenen) ve kalıcı hücreler şeklinde üç gruba ayrılır. Karaciğerin hepatositleri, normal koşullarda mitotik bölünme geçirmeyen fakat mitozu girme yeteneklerini tüm yaşamları boyunca koruyan hücreler olarak stabil hücreler grubuna girerler. Normal olgun karaciğerde hücrelerin %0.5- 1' i bölünmektedir fakat karaciğer kendi kitlesinin 3/4'ünü 6 ayda yeniden yerine koyabilecek bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Prolifere olmak üzere uyarıldıkları bir durumda, protoonkogen aktivasyonu yada tümör gelişimini baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile genetik değişime uğrayabilirler (63).

Karaciğer hücre rejenerasyonunun önemli bir uyarıcısı TGF-alfa'dır. Hücre büyümesinin başlatılması hücre proliferasyonunda yer alan protoonkogenlerin ekspresyonunda artmayla birlikte (ör: c-fos, c-myc ve c-ras)⁽¹⁷⁾. Bunun tersine karaciğer kitlesi yerine konduktan sonra büyümenin durması da, yine karaciğerin kendisi tarafından yapılan büyüme inhibitörleri tarafından sağlanmaktadır. Bunlardan birisi TGF-beta'dır. Bu polipeptidi karaciğerin parankimal olmayan hücreleri (Kupffer hücreleri, İto hücreleri vb) yapar⁽²⁵⁾. İster rejeneratif olsun, isterse neoplastik olsun proliferasyon hücre siklusuna girerek çoğalma şeklinde olmaktadır.

Hücre Siklusu:

Hücre siklusu ilk tanınmaya başlandığı yıllarda kabaca mitoz fazı (M fazı) ve interfaz olarak ikiye ayrılmıştır. Bugün interfazın, aktif hücre bölünmesini içermeyen, birbirini izleyen G1, S ve G2 fazlarından oluştuğu kabul edilmektedir ⁽³⁶⁾. S fazı, DNA'nın replike olduğu ayrı bir periyoddur, mitozun başlamasından bir süre önce gerçekleşmektedir süresi 6-24 saat arasında değişmektedir. Mitoz fazının sonu ile S fazı arasında G1 fazı bulunmaktadır, bu genellikle hücre siklusunun diğer fazlarından daha uzundur ve DNA sentezinden önceki normal hücre metabolizmasını yansıtır. S fazının sonu ile M fazının başlangıcı arasında G2 fazı bulunmaktadır. Bu nispeten kısa sürelidir ve hücrelerin bölünmeye hazırlık yaptığı dönemdir. Mitoz fazı ise profazdan hücre bölünmesine kadar yaklaşık bir saat sürmektedir. Hücre siklusunun G0 olarak isimlendirilen bir bölümü daha bulunmaktadır. Bu bölüm hücre siklusuna girmeyen, mitozla gitmeyen stabil hücre durumunu tanımlamaktadır. G0 fazındaki hücreler uygun biçimde uyarıldıklarında yeniden interfaza geçmektedirler.

Sürekli bölünen (labil) hücreler, bir mitozdan diğerine sürekli hücre siklusuna girerler. Bölünmeyen (kalıcı) hücreler, hücre siklusunu terk etmiştir, yaşlanır ve ölürlür. İstirahat halindeki (stabil) hücreler G₀'da kalıyor gibi düşünülebilir fakat uygun bir uyararla uyarılınca G₁'e geçerler. Hücre siklusu ile bilinmeyen birçok yön bulunmakla birlikte, hücre siklusunun belirli aşamaları ile eş zamanlı olarak fonksiyonel durumu, düzeyi ve/ veya aktivitesi artan birtakım hücresel moleküllerin özellikle proteinlerin varlığı ortaya konmuştur. Bu proteinlerden bazıları; Ki-67, Prolifere olan hücre nükleus antijeni (PCNA), ve DNA polimeraz alfa'dır. Bu proteinlerin ve hücre siklusu ile ilişkili diğer yöntemlerin aracılığı ile çeşitli dokulara ait hücrelerde, özellikle tümör hücrelerinde proliferasyonu ve proliferasyon indeksini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu proliferasyon belirleyicileri, aşağıda özetlendiği gibi hücre siklusunun belirli fazlarını göstermektedirler.

- 1- Mitoz sayısı: M fazı proliferen hücre popülasyonunun küçük bir bölümünü yansıtır ve en kısa sürelidir.
- 2- Timidin işaretleme yöntemi (H-TdR): Bu yöntemde timidin sadece aktif proliferasyon gösteren hücrelerle bağlanır. Bu yöntem aktif S fazındaki DNA sentezini ve hücre siklusunun süresini ölçer.
- 3- Bromodeoksiürüdin işaretleme yöntemi: S fazını gösterir.
- 4- Ki-67: Bu protein hücre siklusunun G₁ fazı ortasında artmaya başlar, G₁, S, G₂ ve M fazında mevcuttur. Hücre siklusuna girmeyen hücrelerin G₀ ve erken G₁ fazlarında bulunmaz. Doku büyüme fraksiyonunun ölçülmesini sağlar.
- 5- DNA Polimeraz-alfa: G₁, S ve G₂ fazında nükleusta, M fazında sitoplazmada bulunur, G₀'da bulunmaz.

6- PROLİFERE OLAN HÜCRE NUKLEUS ANTİJENİ (PCNA):

Miyachi ve arkadaşları⁽⁶²⁾ 1978' de, sistemik lupus eritematozuslu hastaların serumlarında sadece proliferasyon gösteren hücrelerin nükleer antijenleri ile reaksiyon veren bir otoantikör bildirmişlerdir. Böbrek tubulus ve glomerül hücrelerinde, karaciğer parankim hücrelerinde ve uyarılmamış periferik kan lenfositlerinde bulunmayan, buna karşılık lenf nodülleri, dalak ve timustaki birçok hücre ile doku kültüründe jenerasyon siklusunun hızlı olduğu bilinen hücre dizilerinde, ayrıca çeşitli mitojenlerle uyarılmış periferik kan lenfositlerinde de bu nükleus antijenlerinin önemli miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Proliferasyon gösteren hücrelerin nükleuslarında yoğunluklu olarak saptanmasından yola çıkarak da proliferere olan hücre nükleus antijeni adı verilmiştir. Bundan bağımsız olarak, Celis ve arkadaşları⁽¹²⁾, 1984' te iki boyutlu jel elektroforezi yardımıyla proliferasyon gösteren hücrelerde, hücre siklusu ile ilişkili bir nükleus proteini olan Siklin'i tanımlamışlardır. Yine 1984'te Mathews ve arkadaşları⁽⁶⁰⁾, PCNA ile siklin'in aynı protein olduğunu ortaya koymuşlardır.

Prolifere olan hücre nükleus antijeni (PCNA) yada diğer adıyla siklin (Cyclin) 36-kilodalton ağırlığında bir nükleus proteindir ve DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak görev yapar. PCNA hücre siklusu sırasında ortaya çıkan, normal proliferasyon gösteren hücreler ile tümörlerde sentez edilen, sentez hızı hücrelerin proliferasyon ve DNA sentezi hızı ile doğru orantılı olan bir proteindir^(7,12,60,62) İstirahatteki hücreler farklı mitojenlerle uyarıldığında aynı derecede PCNA ve DNA sentezi yapıldığı gösterilmiştir^(6,7). Hücre siklusu sırasında PCNA düzeyleri oynamalar göstermekte, G1 fazının sonunda, DNA sentezinden hemen önce giderek artan miktarlarda hücrelerde belirmekte, S-fazı sırasında özellikle yükselmekte ve G2 fazının başında kaybolmaktadır⁽⁶⁾. Biyolojik yarıömrü

yaklaşık 20 saattir⁽⁸⁾. Organik çözücülerle tespit edilmiş hücrelerde PCNA boyanması DNA sentezinin yer aldığı intranükleer alanlarda lokalize olmaktadır. Aldehitleri kullanarak fikse edilmiş hücrelerde ise PCNA'nin dağılımı farklıdır ve hücre siklusu boyunca yoğun diffüz nükleer boyanma saptanır^(6,62). PCNA'nin S fazı sırasında nükleustaki dağılımının DNA sentezine bağlı olduğu, olasılıkla G1fazı sırasında biraraya gelen, DNA sentezine yardımcı olan ve S-fazının sonunda dağılan bir replikasyon kompleksine dahil olduğu öne sürülmüştür^(8,9). Hem hücre DNA sentezi ve onarımı için, hem de hücre siklusunun ilerlemesi için PCNA'nin gerekli olduğu gösterilmiştir^(45,46).

PCNA'ni hücrelerde ve dokularda göstermeye yönelik çalışmalara otoimmün hasta serumundan elde edilen poliklonal antikörlerin kullanılmasıyla başlanmıştır. Ogata ve arkadaşları^(64,65), 1987' de alkolle veya metakarnla tespit edilmiş histolojik materyalde PCNA ile reaksiyon veren iki monoklonal antikör (19A2 ve 19F4) üretmişlerdir . Bu iki monoklonal antikör , saflaştırılmış tavşan timusundan elde edilmiş denatüre PCNA ile normal farelerin aktif olarak immünizasyonu sonucu elde edilmiştir ve PCNA'in N terminalinde lokalize olan epitoplari tanımlanmaktadır⁽⁶⁵⁾. 19A2 ve 19F4 farklı memeli türlerine ait PCNA'i tanımlanmaktadır⁽⁶⁴⁾. Bununla birlikte doğal PCNA ile immunopresipitasyon yapamamakta ve PCNA'ne bağımlı DNA replikasyonunu inhibe edememektedir⁽⁸⁷⁾.

Daha sonra 1990'da, bakterilerde PCNA'ni ortaya çıkararak denatürasyona neden olmayan koşullarda saflaştırılmış ve bununla farelerin immünizasyonundan elde edilen, 11 yeni monoklonal antikör tanımlanmıştır⁽⁸⁷⁾. Hall ve arkadaşları⁽³⁵⁾ , bu monoklonal antikörlardan PC10 klonunu; normal dokular, meme karsinomu, pankreas tümörü ve Non Hodgkin lenfomayı içeren bir grup doku kesitinde çalışmışlardır.

Normal erişkin dokularında nukleusta diffüz ve/veya granüler boyanma şeklinde izlenen PCNA hücre proliferasyonu ile birliktelik göstermiştir. Boyanma, yazarların aktif proliferasyon gösterdiğini önceden bildikleri dokularda ortaya çıkmıştır. Lenfoid dokuda germinal merkezlerdeki hücrelerde ve parakortekste dağınık birkaç hücrede, çok katlı yassı epitelin bazal tabakasında, kıl follikülü hücrelerinin büyük bir kısmında, mide, ince barsak ve kolonun proliferatif kompartmanlarında izlenmiştir. Endometriumda, proliferasyon fazında gland epiteli ve stroma hücrelerinde pozitiflik saptanırken ileri sekresyon fazında saptanmamıştır. Testislerde spermatogoniaların çoğu boyanırken, spermatidlerde, spermelerde, intersitisyel hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde boyanma olmamıştır. Overde meiotik bölünme halinde olan hücrelerde, hem nukleusta hem sitoplazmada saptanmıştır. Prolifere olmayan hücrelerde yada yenilenme hızı düşük olan hücrelerde (erişkin santral ve periferik sinir sistemi hücreleri, düz kas, kalp kası, normal hepatositler) PCNA boyanması minimal bulunmuştur. Karaciğerde Kupffer hücrelerinde seyrek pozitiflik saptanmıştır.

PC 10 klonu immunoreaktivitesi ısı etkisinde büyük oranda azalmaktadır, formalin, metakarn ve Bouin solusyonu ile tespit edilmiş dokularda kullanılabilir. Metakarnla tespit edilmiş dokularda yalnızca granüler nükleer boyanma izlenirken, diğer solusyonlarla tespitten sonra diffüz ve granüler nükleer boyanma saptanmıştır.

PCNA' nin normal dokularda gösterilmesi proliferatif potansiyeli yakından yansıtmakla birlikte, neoplazmlarda daha karmaşık ekspresyon biçimleri görülmektedir. Proliferasyonla birlikte olan çeşitli belirleyicilerin prognozla ilişkilerinin, farklı tümör tiplerinde değişkenlik göstermesi PCNA için de geçerlidir. Non-Hodgkin Lenfomalarda DNA flow sitometri, Timidinle İşaretleme, Ki-67 ve PCNA'nin immünohistokimyasal yöntemle

gösterilmesi gibi proliferasyonu belirleyen tekniklerin tümü prognozla iyi korelasyon göstermektedir(22,35,47,54,80,90). Hemanjioperisitomlarda, PCNA ile prognoz ve histolojik derece arasında anlamlı ilişki gösterilmişken, DNA flow sitometri bu tümörlerde sağ kalım oranı ile bir ilişki göstermemektedir(92). Mide karsinomunda ve gastrointestinal sistemin stromal tümörlerinde PCNA boyanmasının, histolojik derecelendirme ve prognozla korelasyon gösterdiği bulunmuştur(3,44,93). Filipe ve arkadaşları (27), mide karsinomunun prekürsör lezyonlarında, PCNA indeksinde artış ile glandlardaki PCNA pozitif zonda normal kontrollere göre lokalizasyon değişikliği ve genişleme saptamışlardır. Akciğer tümörlerinde, özellikle küçük hücreli tipte olmayan Akciğer karsinomlarında PCNA ile AgNOR sayımı, mitotik indeks ve prognoz arasında korelasyonun varlığı gösterilmiş, flow sitometrik DNA analizi ile heterojen DNA içeriği saptanan tümörlerde PCNA indeksinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (11,28,42,83). Prognoz ve PCNA arasında ilişki böbrek adenokarsinomlarında, santral sinir sistemi neoplazmlarında da gösterilmiştir (1,21,34). PCNA ekspresyonunun melanositik lezyonlarda da malign transformasyonla birlikte olduğu bulunmuştur (67,81).

Bununla birlikte, en azından bazı tümörlerde PCNA ekspresyonu ile hücre proliferasyonu arasındaki ilişki kaybolmuştur. Bunun en belirgin örneği meme kanseridir. Meme kanserinde, PCNA'nin (hem 19 A2 hem de PC 10) prognozla ilişkisi gösterilemezken, bu tümörlerde DNA flow sitometri prognozu belirleme yönünden değer taşımaktadır(20,32,58). Bu gibi durumlarda tek başına PCNA boyanması hücre proliferasyonunun bir belirleyicisi olarak kullanılamaz. Tümörlerdeki bu karmaşık sonuçların, DNA hasarı ve onarımının tümör hücrelerinde daha yüksek oranlarda olması ve/veya büyüme faktörlerinin yapımının değişmiş olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (46).

GEREÇ VE YÖNTEM:

OLGULAR:

Bu çalışmaya, serumda HBV markerları pozitif bulunan ve 1989-1993 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Kronik Aktif Hepatit tanısı almış olan 20 Olgu, Kronik Aktif Hepatit Sirozu tanısı almış olan 20 olgu alındı. Siroz zemininde gelişen HCC olguları, EÜTF Patoloji Anabilim dalında, 1979- 1993 yılları arasında bu tanıyı alan 50 olgu içinden seçildi. Bunlardan 12 tanesinde serumda HBV belirleyicileri pozitif. Kalan 38 olguda ise immünohistokimyasal yöntemle dokuda HBcAg'nin varlığı araştırıldı ve sekizinde pozitif bulundu. Sonuçta HBV belirleyicileri pozitif olan 12 olgu ile dokuda HBcAg pozitif olan sekiz olgu (toplam 20 olgu) çalışmanın "HBV' na bağlı siroz zemininde gelişen HCC" grubu olarak çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubu olarak ise 10 normal karaciğer biyopsisi seçildi.

KAH ve KAHS olgularının tümünde incelenen doku örnekleri iğne biyopsisi materyali iken, siroz zemininde gelişen HCC olgularının beşi kama biyopsi, ikisi parsiyel hepatektomi, 13'ü ise iğne biyopsi materyeli idi.

Tüm olgularda serolojik belirleyiciler, laparoskopik inceleme bulguları ve tedavi planları incelenerek klinik korelasyon sağlandı. KAH ve KAHS grubunda, hastaların interferon tedavisi almadan önce yapılmış olan biyopsi materyalleri çalışma kapsamına alındı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME:

Tüm olgularda ilk tanının doğrulanması, rejenerasyon ve hepatosellüler displazinin belirlenmesi amacıyla Hematoksilen-Eozin ve retikulum boyaları uygulanan kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi. Hepatosellüler displazi, varlığı yada yokluğu yanısıra, varolan olgularda

şiddeti açısından da değerlendirildi. Displazinin şiddetini belirlemede Cohen ve arkadaşlarının⁽¹⁶⁾ önerdiği kriterler kullanıldı ve olgular aşağıda belirtilen kriterlere göre üç dereceye ayrıldı;

Derece 1: (+):Tüm materyalde herbiri dörtten az displastik hepatositten oluşan, en fazla altı tane displastik odak varlığı.

Derece 2 (++): Tüm materyalde iki ile altı displastik hepatositten oluşan, altıdan fazla displastik odak varlığı.

Derece 3 (+++): Kesitte izlenen lobül yada rejenerere nodül yapılarının büyük bir kısmını tutan ve altı yada daha çok hepatosit grupları halinde yaygın displazi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:

İmmünohistokimyasal yöntemle HBcAg ve PCNA'nin varlığını göstermek için, %10'luk tamponlanmış formalinle tespit edilmiş olan dokulardan 3 mikron kalınlığında kesitler, jelatinle kaplanmış lam üzerine alındı ve en az bir gece oda ısısında havada kurutuldu. Üç ksilol solüsyonu ve azalan yoğunlukta üç alkol solüsyonundan geçirildikten sonra distile su ile yıkanan kesitlere, işaretlenmiş streptavidin ve biyotin (labelled streptavidin-biotin) yöntemi (DAKO LSAB kit, kod no: K 680) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda ısısında, nemli ve kapalı bir ortamda yapıldı. İnkübasyonlar arasındaki tüm yıkamalar için Fosfatlı Tampon Solüsyon (PBS) kullanıldı. Negatif kontrol olarak DAKO firmasına ait negatif kontrol solüsyonu (DAKO Negative control for LSAB kits, kod no: N 1556) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak; Anti-PCNA ile boyamada tonsil dokusu kesitleri, Anti-HBcAg ile boyamada, önceden HBcAg'nin dokuda varlığı gösterilen bir KAH olgusuna ait doku kesitleri kullanıldı.

Anti- HBcAg ile boyama yöntemi:

Dokularda endojen peroksidaz aktivitesi %0.3'lük metanol-H₂O₂ solüsyonu ile 30 dakika inkübe edilerek bloke edildi, ardından distile su ile yıkandı. Doku kesitleri beş dakika bloke edici serum ile inkübe edildi, tampon solüsyonu ile yıkama yapılmadan, üzerlerindeki fazla solüsyon akıtıldı ve çevreleri kurulandıktan sonra anti-HBcAg solüsyonundan (primer antikör; DAKO anti- HBcAg, kod no: N 1556) üzerlerini örtecek miktarda damlatıldı ve 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra sırasıyla, bağlayıcı solüsyon (link) ile beş dakika, streptavidin solüsyonu ile beş dakika ve AEC kromojen-substrat solüsyonu (DAKO AEC, kod no: K 696) ile inkübe edildi. Distile su ile üçkez yıkandıktan sonra asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksileni ile zıt boyama yapıldı, distile su ile yıkandı, amonyaklı suya 10 kez batırılıp çıkarıldı, distile suda iki dakika bekletildikten sonra gliserin içeren su bazlı bir kapatma maddesi (DAKO-Glycerogel, kod no: C 563) ile kapatıldı.

Anti-PCNA ile boyama yöntemi:

Anti-PCNA ile boyama yöntemi, temel olarak yukarıda tarif edilen şekilde olup primer antikör (anti-PCNA) basamağı dışındaki tüm basamaklar aynıdır. PCNA antikörü olarak konsantre antikör solüsyonu PC 10 (DAKO, kod no: M 879) kullanılmıştır. Bu primer antikör için önerilen dilüsyon oranı 1:50- 1:100'dür. Bu çalışmanın yürütüldüğü laboratuvar koşulları için uygun dilüsyonu saptamak amacıyla, primer antikörün 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:50; 1:60, 1:80, 1:100 ve 1:200'lük solüsyonları hazırlandı ve pozitif kontrol (tonsilla) doku kesitlerinde tüm dilüsyonlarda; oda ısısında bir saat ve 4 santigrad derecede 22 saat olmak üzere iki ayrı inkübasyon biçimi denendi. Zeminde artefakt boyanma içermeyen optimum nükleer boyanma 1:80 dilüsyonda ve bir saat oda ısısında inkübasyon ile elde edildiği için çalışmaya alınan olgularda PC10 bu dilüsyon ve sürede inkübe edildi.

PCNA pozitifliğinin değerlendirilmesi ve PCNA boyanma indeksinin sayımı, alan bölmeli bir oküler (x10) yerleştirilen standart ışık mikroskobunda x40 objektif ile yapıldı. Doku kesitlerinde PCNA pozitifliğinin maksimum ve minimum olduğu beşer alan sečilerek toplam 10 alanda 1 000 hepatosit sayıldı. Bu alanlarda granüler yada diffüz tüm nükleer boyanmalar, değerlendirmede subjektiviteye neden olmamak için, boyanma şiddetindeki farklılıklara bakılmaksızın pozitif kabul edildi. Bazı olgularda zeminde sitoplazmalarla sınırlı artefakt boyanma dikkati çekti. Artefakt boyanma bulunan hücrelerde nükleer boyanma, sitoplazmik boyanmadan koyu ve belirgin şekilde nükleusta sınırlı ise pozitif kabul edildi. Sitoplazma boyanmasına eşit yoğunlukta ya da bundan daha soluk nükleer boyanma içeren hücreler, sayıma alınmadı. PCNA boyanma indeksi, pozitif hücrelerin sayısı olarak ifade edildi.

BULGULAR:

Olguların yaşa ve cinse göre dağılımı değerlendirildiğinde; KAH grubunda 13'ü erkek (%65), yedisi (%35) kadın; KAHS grubunda 14'ü erkek (% 70), altısı kadın (% 30); Sirozla birlikte olan HCC grubunda 18'i (% 90) erkek, ikisi (% 10) kadın olarak bulundu. KAH grubunda ortalama yaş 38.65, standart sapma 12.85 iken, KAHS grubunda ortalama yaş 43.65, standart sapma 18.51, sirozla birlikte olan HCC grubunda ise ortalama yaş 56.75, standart sapma 11.75 idi. HCC içeren siroz grubu KAH ve KAHS grubundan anlamlı şekilde yaşlıydı (SD: 2/57; F= 8.11; p< .001).

Olgularımızda HBV virusu yanısıra, HCV virusunun da olup olmadığını anlayabilmek için serum da Anti-HCV sadece KAH ve KAHS olgularında saptanabilmişti. KAH grubunda dört olguda, KAHS grubunda ise altı olguda anti-HCV pozitif bulundu. Bu olgularda HBV enfeksiyonuna özgü bulgular yanısıra, yağlanma, portal alanlarda lenfoid follikül oluşumu gibi HCV enfeksiyonuna özgü bulgular da saptandı.

Rejenerasyon Bulguları:

Hücre rejenerasyonunun morfolojik olarak değerlendirilmesi için kullanılan kriterler; kordonsal düzen bozukluğu alanlarında displazik özellik taşımayan hepatositlerde binükleasyon veya multinükleasyon, nükleer hiperkromazi, polimorfizm ile rozet oluşumlarıdır (Resim 1-2). Bu çalışmada da bu kriterler histopatolojik incelemede değerlendirildi ve multinükleasyon dışında diğer tüm kriterler varlığı ya da yokluğu açısından araştırılırken, multinükleasyon birden fazla nükleus taşıyan hepatositlerin rastgele seçilen 10 büyük büyütme alanında sayılması ile belirlendi.

Kordonsal düzen bozukluğu yada kordonlarda kalınlaşma tüm olgularımızda değişik derecelerde izlendiği için üç grup arasındaki karşılaştırmalara bu kriter alınmadı. Diğer kriterlere ait değerler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo -2: Histopatolojik olarak değerlendirilen rejenerasyon bulgularının gruplara göre dağılımı.

Olgular	Nükleer Hiperkromazi	Polimorfizm	Rozet Yapıları	Multinükleasyon (Ortalama+SS)
KAH (20)	14 (%70)	12 (%60)	10 (%50)	33.05+19.74
KAHS (20)	12 (%60)	11 (%55)	17 (%85)	51.60+24.29
HCC+Siroz (20)	13 (%65)	18 (%90)	19 (%95)	50.70+30.67

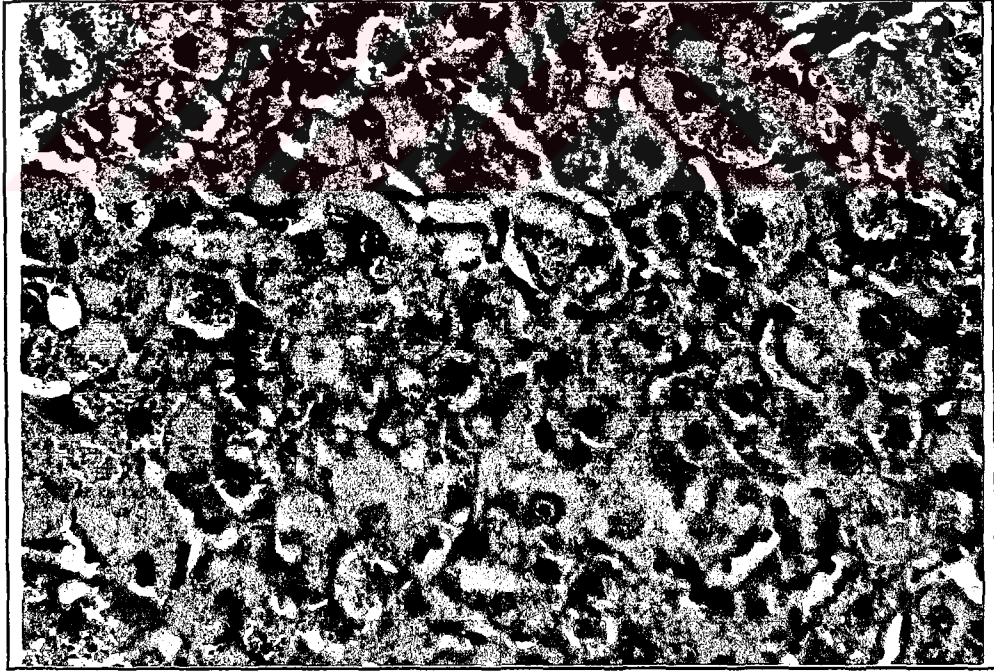
Multinükleasyon KAH grubunda, KAHS ve HCC içeren siroz gruplarına oranla belirgin şekilde düşük bulundu. Üç tanı grubu multinükleasyon değerleri açısından karşılaştırıldığında, gruplar arasında farklılık saptandı (SD:2/57; F: 3.41; p<0.05). HCC içeren siroz grubu ile KAHS grubunun değerleri, KAH grubundan anlamlı şekilde yüksek iken, HCC içeren siroz grubu ile KAHS grubu arasında farklılık yoktu.

Nükleer hiperkromazi, KAH grubunda 14 olguda (%70), KAHS grubunda 12 olguda (% 60), HCC içeren siroz grubunda 13 olguda (%65) izlendi. Nükleer hiperkromazi açısından her üç grup arasında istatistiksel önem taşıyan farklılık saptanmadı.

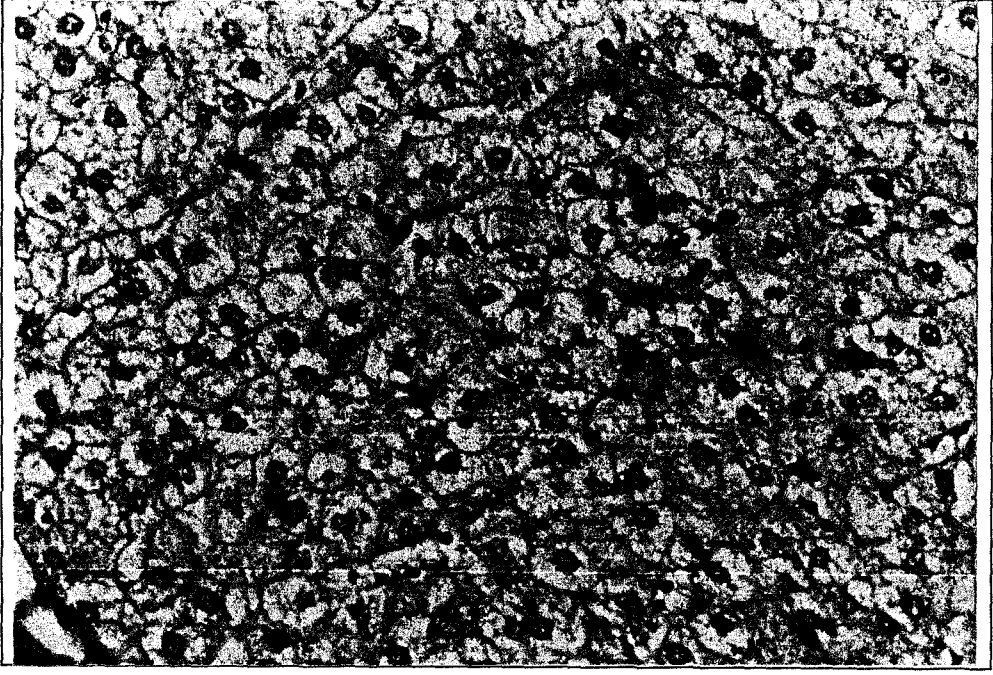
Nükleer Polimorfizm KAH grubunda 12 olguda (% 60), KAHS grubunda 11 olguda (% 55) olguda, HCC içeren siroz grubunda ise 18 olguda (%90) saptandı. Polimorfizm değerlendirilirken, hepatosellüler displaziden ayırıcı

tanısı yapıldı. Gruplar halinde izlenen displastik hücrelerden farklı olarak polimorfizm dağınık hücrelerdeki izole irilik farkı olarak tanımlandı. Polimorfizm açısından değerlendirildiğinde HCC içeren siroz grubu, KAH ve KAHS grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık taşıyordu (χ^2 4.68; $p < 0.05$)

Rozet formasyonları KAH grubunda 10 olguda (%50), KAHS grubunda 16 olguda (% 80), HCC içeren siroz grubunda 19 olguda (%95) saptandı. KAH grubunun değerleri KAHS ve HCC içeren siroz grubuna oranla belirgin şekilde düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak da gösterildi ($p < 0.05$), KAHS ve HCC içeren siroz grubu arasında ise böyle bir farklılık yoktu.



Resim -1: Bir KAHS olgusunda kordonsal yapıda kalınlaşma ve düzensizlik, nükleer hiperkromazi ve buzlu cam hücreleri (HE x 40).



Resim -2: HCC içeren bir siroz olgusunda rozet oluşumları (HE x40).

Hepatosellüler Displazi Bulguları:

Tüm olgularda hepatosellüler displazinin değerlendirilmesinde en büyük zorluk nükleer hiperkromazi ve polimorfizmin displazik değişikliklerden ayırt edilmesinde yaşandı. Bu ayırımında en büyük yardımcı, displazik hücrelerin gruplar halinde olması, nükleus ve sitoplazmalarının genişlemesi, nükleus çeperlerinin normale oranla düzensizleşmesidir (Resim 3-4-5). Buna karşılık nükleer hiperkromazi nükleusta düzensiz çeper ve irileşme olmaksızın hiperkromatik boyanma şeklindedir. Nükleer polimorfizm ise hiperkromazi olmadan nükleus büyüklüğünün artması şeklinde izlenmektedir.

Bu kriterler esas alınarak tanımlanan hepatosellüler displazi, daha önce anlatılmış olduğu gibi displastik odakların sayısı ve her bir displastik odağın içerdiği hücre sayısını esas alan bir değerlendirme ile derecelendirilmiştir.

Derece 1, 2 ve 3 olarak değerlendirilen olguların tanı gruplarına göre dağılımı Tablo 3'de gösterilmiştir.

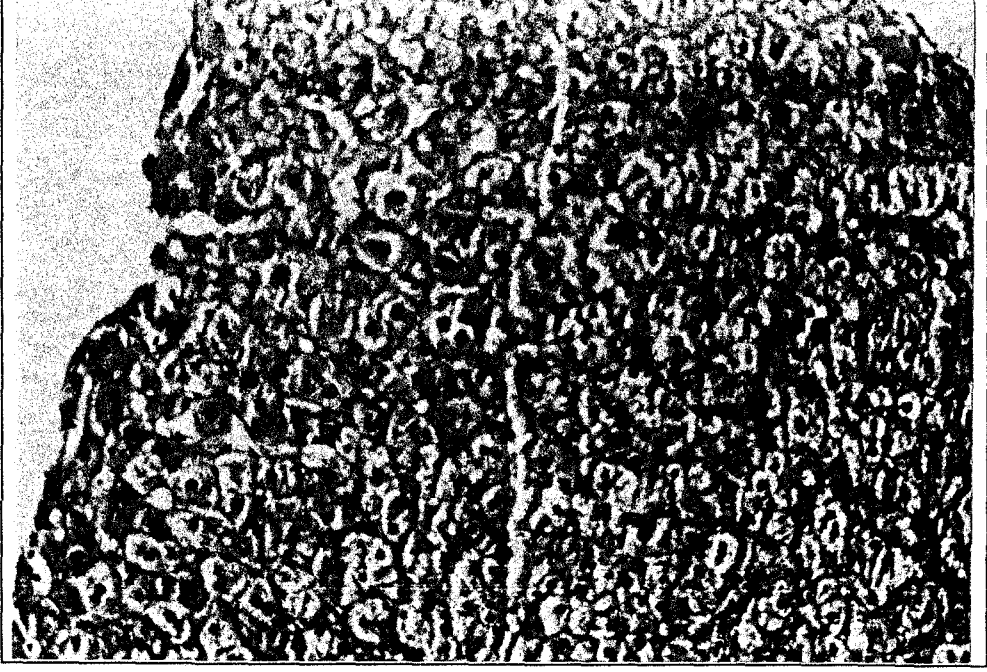
Tablo- 3: Çalışmadaki olguların hepatosellüler displazi değerleri.

Tanı	Derece 1	Derece 2	Derece 3
KAH	3 (% 15)	1 (% 5)	1 (% 5)
KAHS	6 (% 30)	2 (% 10)	2 (%10)
HCC içeren siroz	5 (% 25)	1 (% 5)	5 (% 25)

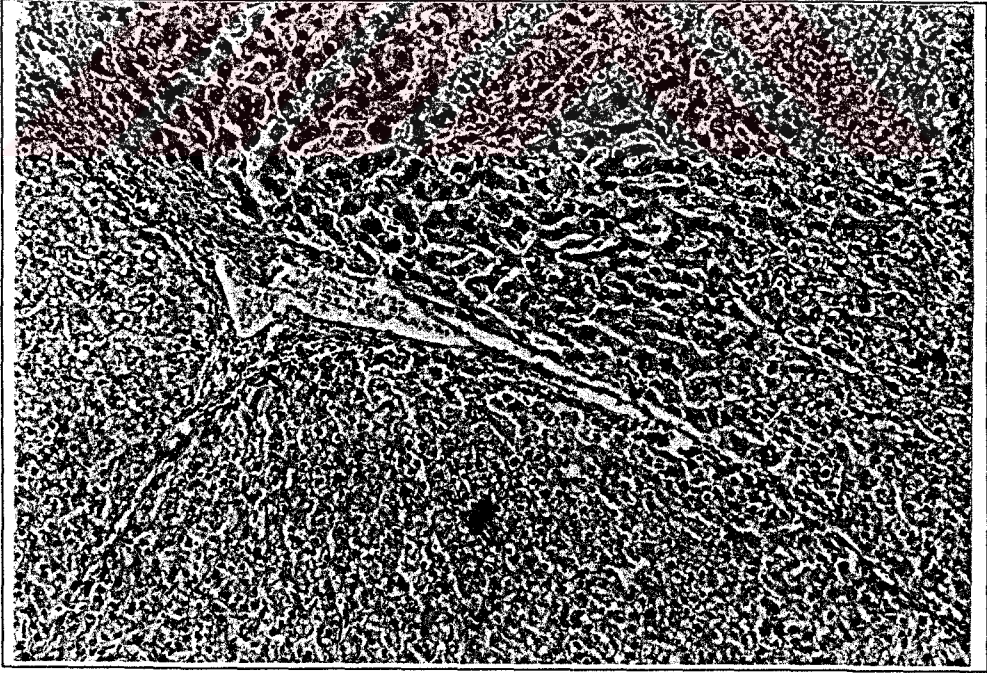
Hepatosellüler displazi bu şekilde değerlendirilmekle birlikte, displastik hücrelerin gruplar oluşturması ve bu grupların da yaygın olmasının daha önem taşıdığı vurgulanmaktadır⁽¹⁶⁾. Diğer bir değişle displazinin şiddetinin tanısal değer taşıdığı ve Derece 2 ve 3'ün gerçek displaziyi temsil ettiği bildirilmiştir. Bunu sorgulamak amacıyla olgularımızda Derece 2 ve 3'ün gruplara göre dağılımını incelendiğinde HCC içeren siroz grubunda, Derece 2 ve 3'ün daha fazla görüldüğü dikkati çekmiştir. Fakat aradaki bu sayısal farka rağmen istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır. Tanısına bakılmaksızın displazisi olanlarla (14; ort: 51,78; SS: 15.1) olmayanların (34; ort: 42.67,SS: 17.24) sayısı yaş açısından karşılaştırıldığında, displazisi olanların daha yaşlı olduğu saptandı fakat bu istatistiksel öneme ulaşmıyordu. Tanılar dikkate alınmadan, displazinin şiddeti açısından olguların yaş ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı.(F: 1.18; SD: 3/56; p> .05)



Resim -3: KAH'li bir olguda Derece 1 Displazi. Resimin sağ alt bölümünde izlenen dördü grupta nukleus ve sitoplazmada belirgin irileşme, hiperkromazi ve nukleus çeperlerinin düzensizliği dikkati çekmektedir. Yukarı bölümde ortada ise hafif hiperkromazi, nukleus ve sitoplazmada genişleme yanısıra intranükleer sitoplazmik inklüzyonlar gösteren ikili bir odak bulunmaktadır (HE x20).



Resim -4: Derece 2 displazi içeren bir KAH olgusunda odaklardan biri resmin ortasında izlenmektedir (HE x10).

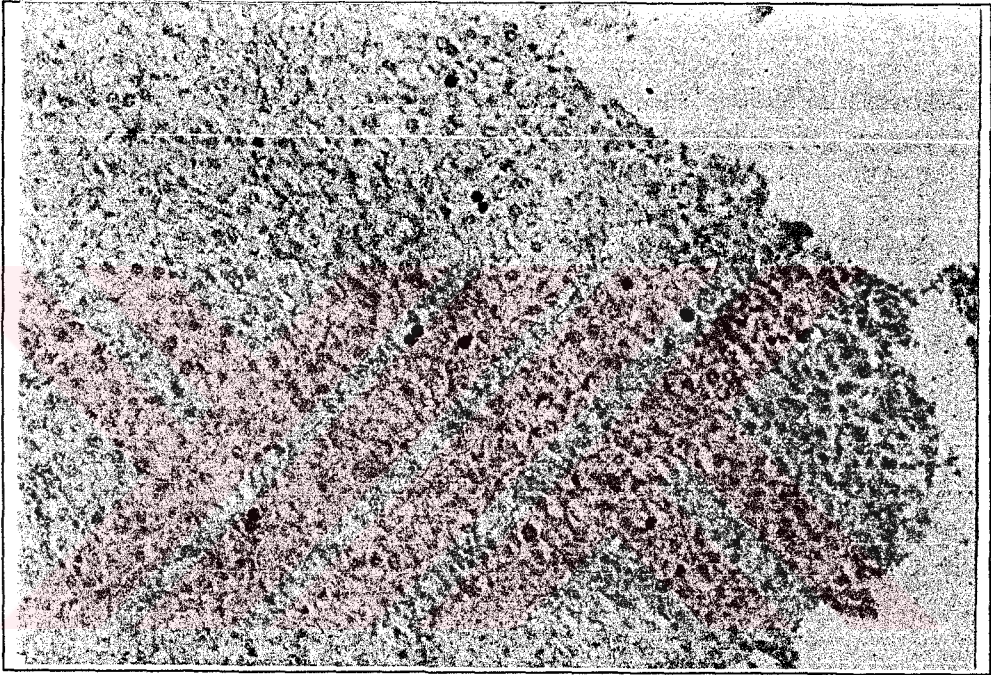


Resim-5: HCC içeren bir siroz olgusunda nodül yapısının büyük bir kısmını kaplayan Derece 3 Displazi (HE x10).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME BULGULARI:

HBcAg POZİTİFLİĞİ:

HBcAg'ni, HBV enfeksiyonunun varlığını kanıtlamak amacıyla sadece serolojik özellikleri bilinmeyen HCC ile birlikte olan siroz olgularında araştırıldı. Bu olgulardan sekizinde hepatosit nükleuslarında pozitif boyanma saptandı (Resim 6).

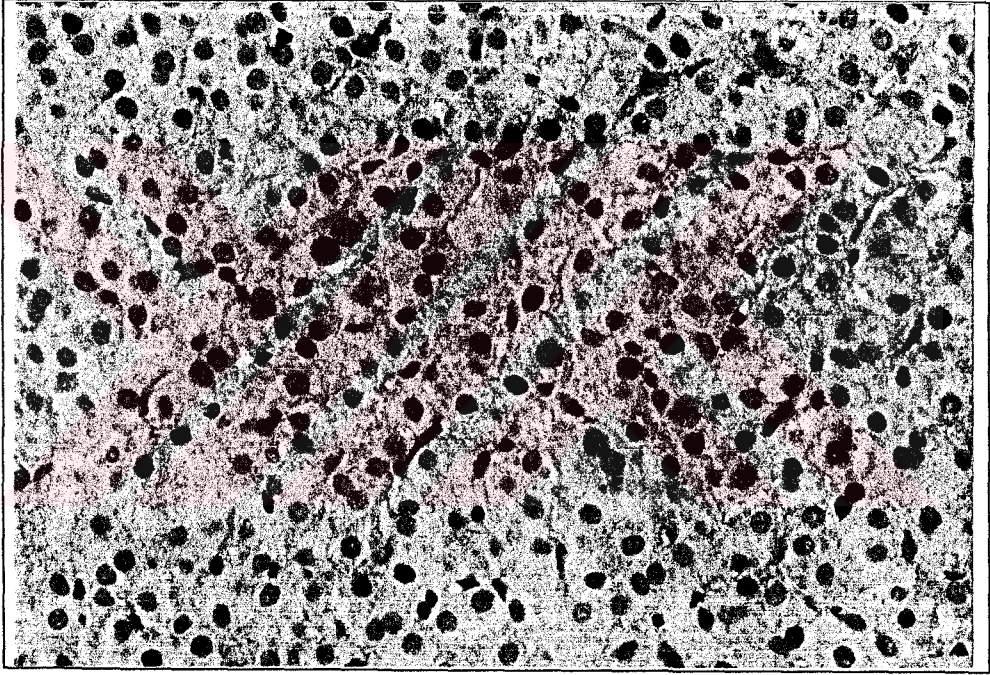


Resim-6: HCC içeren siroz olgularından birinde HBcAg Pozitifliği.
(Anti-HBc, LSAB x40)

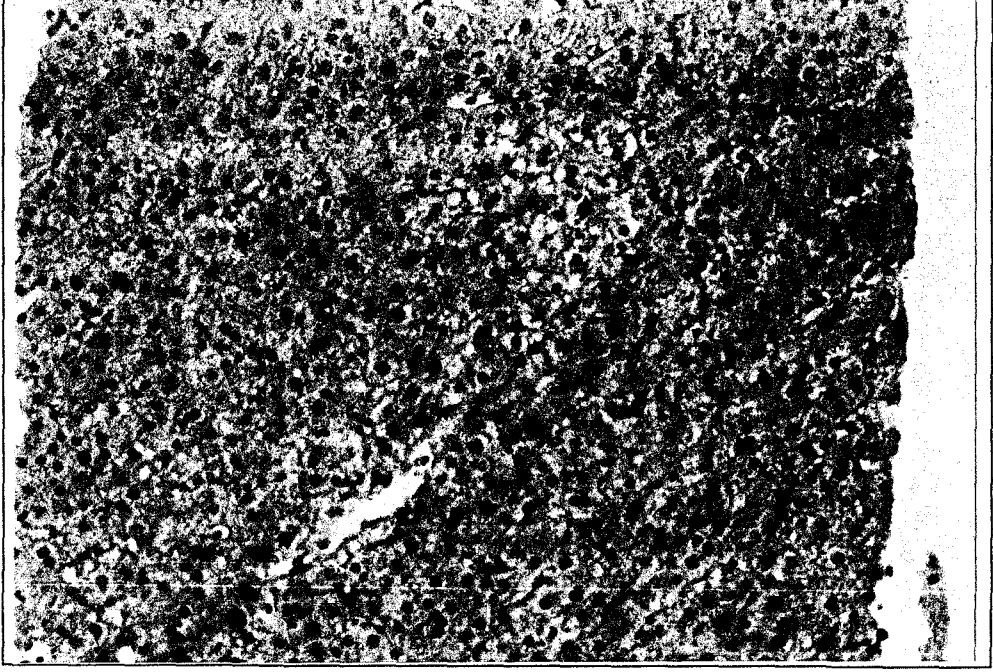
PCNA POZİTİFLİĞİ:

PCNA pozitifliği, değişik yoğunluklarda, granüler yada diffüz nükleer boyanma şeklinde idi (Resim 7). Normal karaciğer dokusuna ait örneklerde minimal boyanma izlendi (Resim 8). Bazı olgularda izlenen, yaygın sitoplazmik zemin boyanması, karaciğerin endojen biotin aktivitesi ile kullanılan immünperoksidaz yöntemin streptavidin-biotin içeriğinden kaynaklanan bir çapraz reaksiyon olarak değerlendirildi (19). Hepatositler

yanısıra, değerlendirmeye alınmayan PCNA pozitifliği bazı lenfositlerde, Kupffer hücreslerinde ve nadiren safra kanalı epitel hücrelerinde saptandı. Binükleer hepatositler çoğu kez pozitifli, ilginç olarak birkısımında boyanma hepatositin iğerdiği iki nukleustan yalnızca birinde lokalize idi (Resim 7).



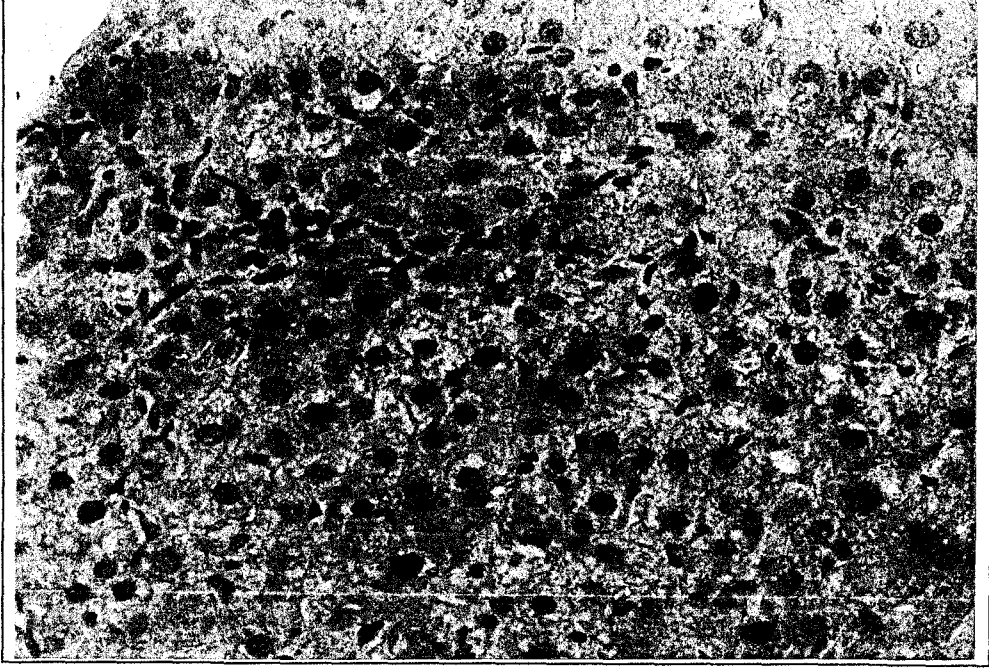
Resim-7: Hepatositlerde değişik yoğunluklarda anti-PCNA pozitifliği, Binükleer hepatositlerin bir kısmında pozitiflik iki nukleustan birine lokalize olmuş durumda (Anti-PCNA, LSAB x40).



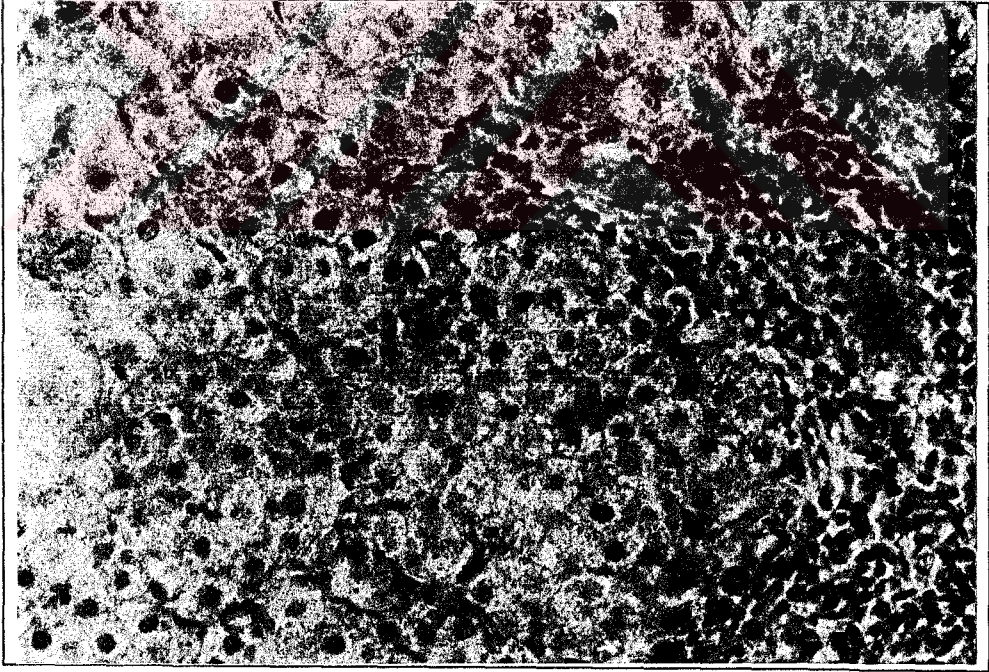
Resim-8: Normal Karaciğer dokusunda minimal anti-PCNA pozitifliği.
(Anti-PCNA, LSAB x20)

KAH olgularında PCNA pozitifliği çoğu kez aktif inflamasyonun yoğun olarak izlendiği periportal bölgelerde, piecemeal nekrozlarının çevresinde ve lobül içindeki fokal nekroz odaklarının çevresinde lokalize idi (Resim 9-10). Rejenere hepatositlerin ve bunların oluşturduğu rozet yapılarının hemen daima pozitif boyandığı gözlemlendi.

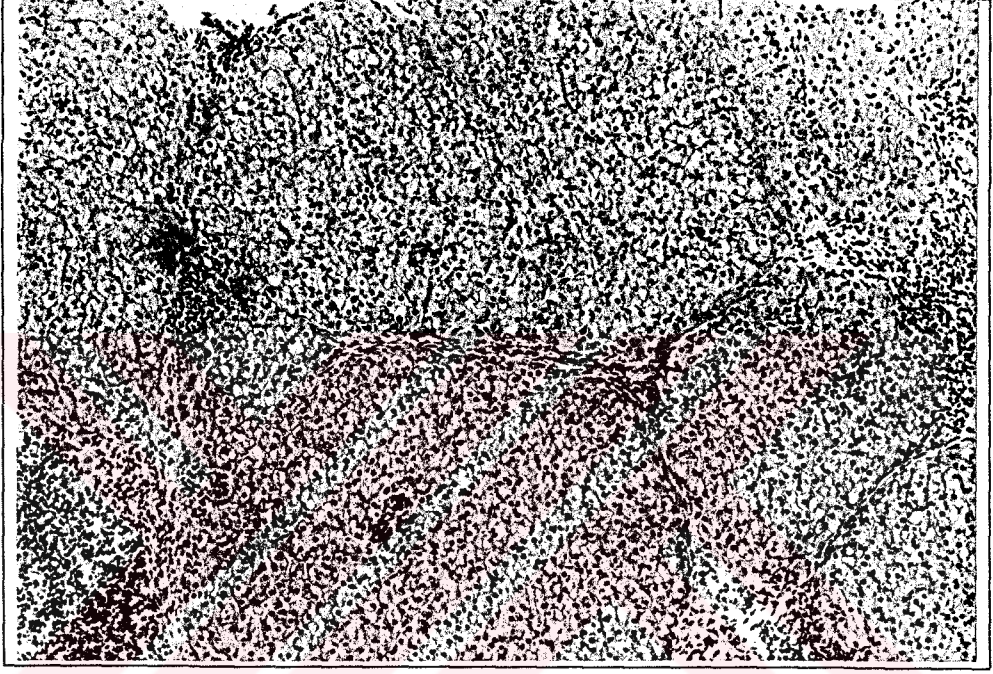
KAHS'da PCNA pozitif olan hücrelerin dağılımı, aktif inflamasyon ve aktivitenin sürdüğü olgularda, fokal nekroz, piecemeal nekrozu ve rejenere hücre gruplarının dağılımı ile paralellik gösterirken (Resim 11), yangısal yanıtın daha hafif olduğu olgularda rejenere hücrelere paralel düzensiz dağılım göstermekteydi (Resim 12). Bazı olgularda sadece siroz nodüllerinin periferinde PCNA pozitifliği gözlemlendi.



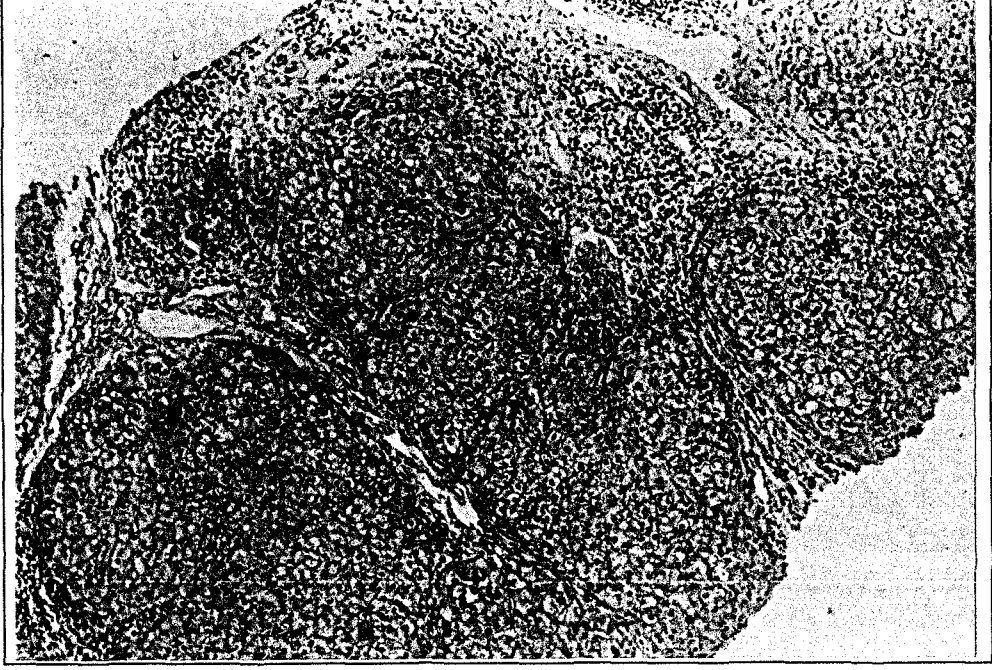
Resim-9: Bir KAH olgusunda aktif inflamasyon alanlarının çevresinde PCNA pozitifliği gösteren hepatositler (Anti-PCNA, LSAB x40)



Resim-10: KAH olgularından birinde piecemeal nekrozu çevresinde PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x40).

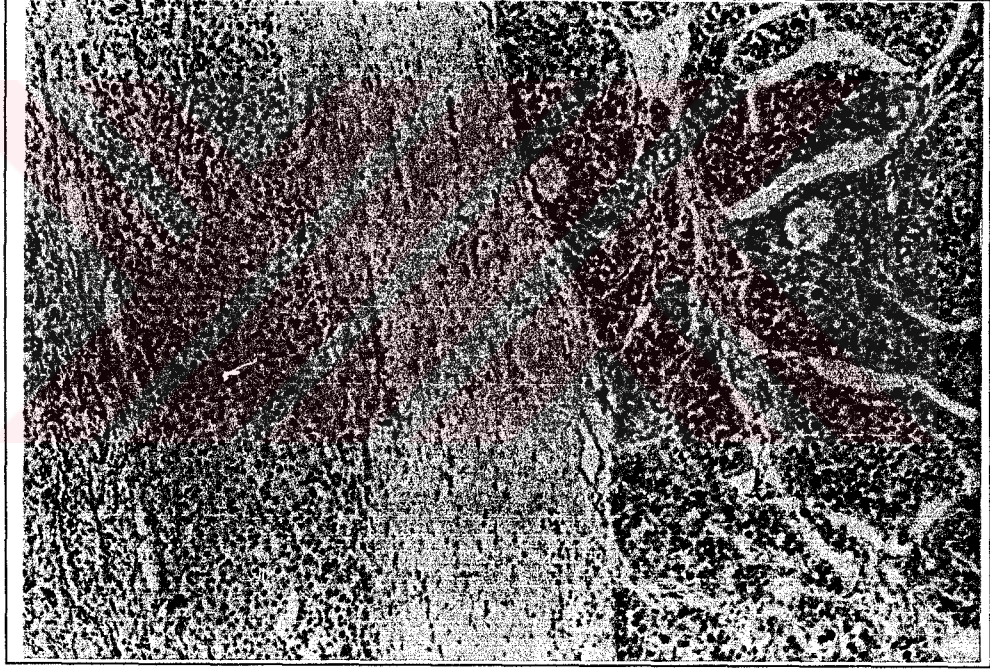


Resim-11: Yangısal aktivitesi belirgin bir KAHS'nda, tüm nodüllerde fokal nekroz odaklarının çevresinde, altta lokalize nodülde piecemeal nekrozu etrafında ve dağınık küçük rejenerere hepatositlerde yaygın PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x10).

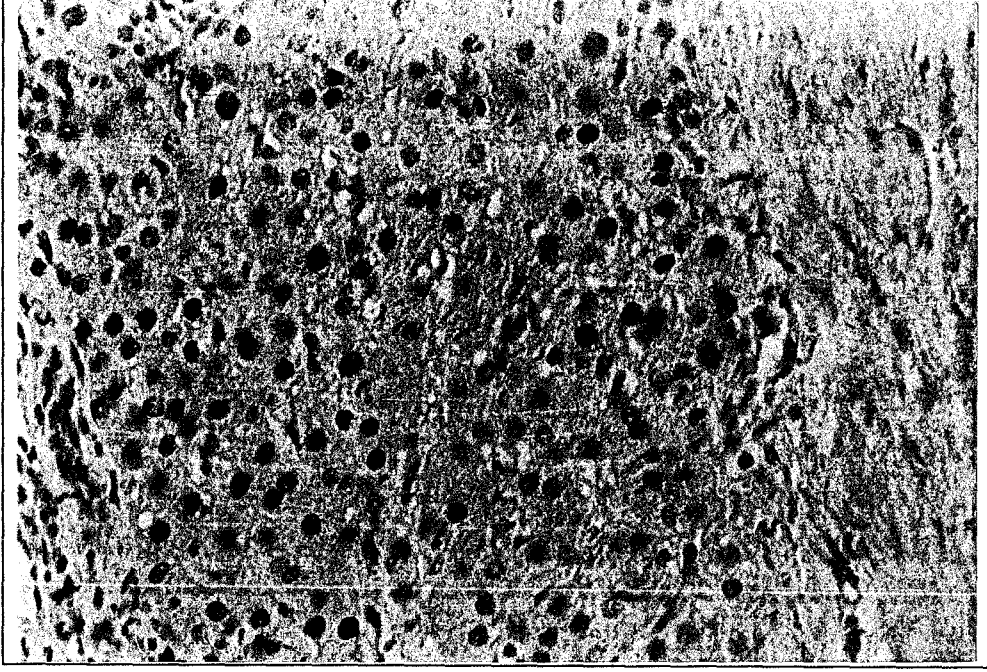


Resim-12: Bir KAHS olgusunda, belirgin yangısal aktivitenin izlenmediği resmin sol alt bölümündeki nodülde PCNA pozitifliği daha çok az sayıda rejenerere hücrede dikkati çekerken, üstteki nodülde piecemeal nekrozu çevresinde belirgin PCNA pozitifliği izlenmekte (Anti-PCNA, LSAB X10).

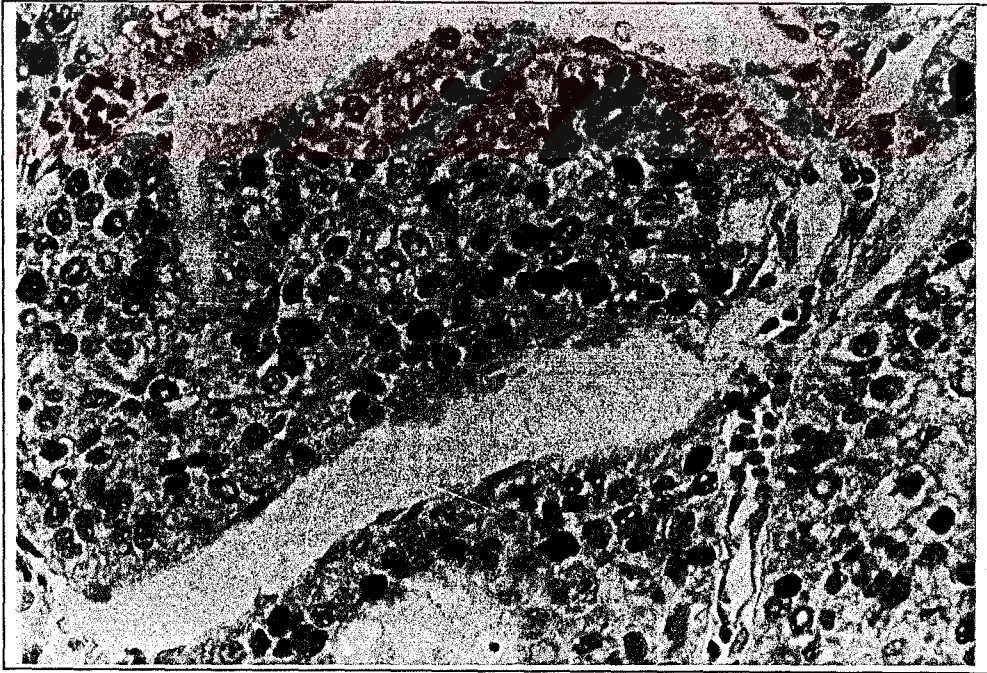
HCC'un eşlik ettiği siroz olgularında, siroz dokusunda PCNA ile boyanan hepatositler bazı nodüllerde nodülün periferik kısmında lokalize olurken çoğu kez nodül içinde diffüz bir dağılım gösterdiği dikkati çekti (Resim 13-14). Aynı olgulardaki HCC dokusunda, tümör hücreleri arasında PCNA pozitif hücreler küçük oadıklar halinde idi ve rastgele dağılım gösteriyordu (Resim 15).



Resim-13: Siroz zemininde HCC gelişen bir olguda siroz ve HCC alanlarında PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x10)



Resim-14: Resim 13'teki olgunun siroz dokusundaki PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB X40).



Resim-15: Aynı olguda tümör alanlarında PCNA pozitif tümör hücreleri (Anti-PCNA, LSAB x40).

Anti- PCNA ile pozitif boyanan hücre oranının ortalama değeri ve standart sapması, KAH'te 191.40 ± 48.31 , KAHS'unda 167.95 ± 35.81 , HCC ile birlikte olan siroz olgularında, sirotik dokuda 248.50 ± 63.04 , tümörlü dokuda ise 410.20 ± 109.74 'tü (Tablo 4). Bu sonuçlara göre, PCNA proliferasyon indeksi HCC'un eşlik ettiği siroz olgularındaki tümör dokusunda en yüksek düzeyde iken, bunu tümöre komşu siroz alanlarına ait proliferasyon indeksi izlemekte idi. KAH ve KAHS'nda PCNA indeksi daha düşüktü ve bu iki grup içinde de KAH grubu KAHS grubuna oranla daha yüksek bir proliferasyon indeksine sahipti.

Tablo -4 : Tüm olgularda PCNA indeksleri

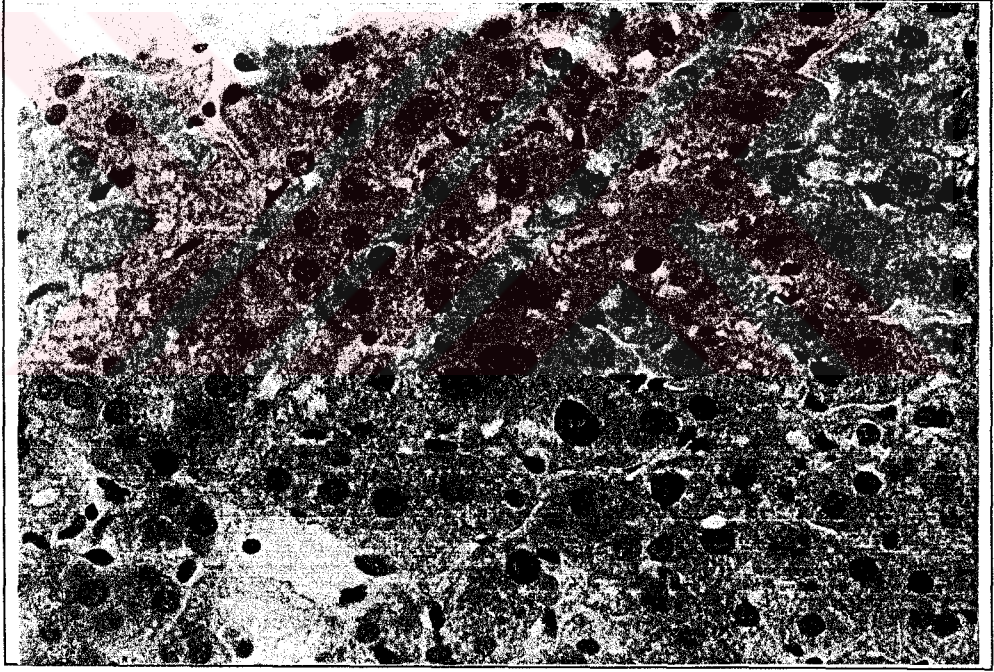
OLGULAR	PCNA İNDEKSİ
NORMAL KARACİĞER (10)	25 ± 18.53
KRONİK AKTİF HEPATİT (20)	191.40 ± 48.31
KRONİK AKTİF HEPATİT SİROZU (20)	167.95 ± 35.81
HCC+SİROZ (20)	
Siroz alanlarında	248.50 ± 63.04
Tümör alanlarında	410.20 ± 109.74

Olguların PCNA indekslerinin Varyans analizi ile incelenmesinde HCC içeren siroz grubundaki tümöre ait PCNA indekslerinin, KAH, KAHS ve HCC içeren siroz olgularındaki siroz alanlarının PCNA indeksinden anlamlı şekilde farklı olduğu bulundu. Benzer bir farklılık, HCC içeren siroz olgularındaki siroz dokusuna ait değerlerle KAHS ve KAH gruplarına ait değerler arasında saptandı. KAH ve KAHS grupları arasında PCNA

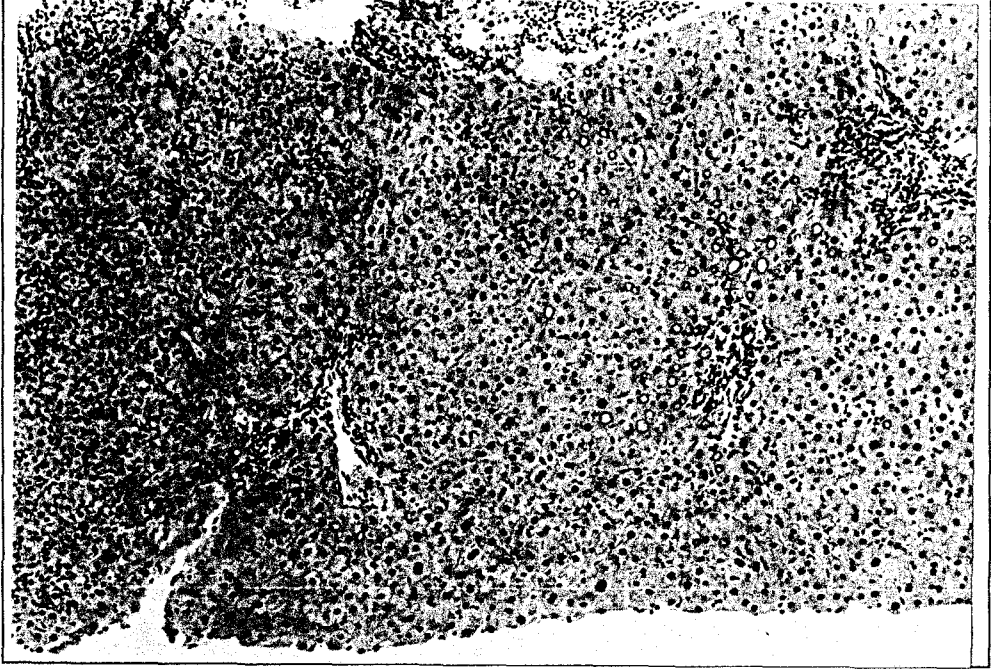
indeksi yönünden sayısal değer olarak bir farklılık olmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

HCV varlığının PCNA indeksini etkileyip etkilemediğini saptamak için anti-HCV pozitif 10 olgu ile anti-HCV negatif 30 olgunun PCNA indeksleri karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak fark saptanmadı.

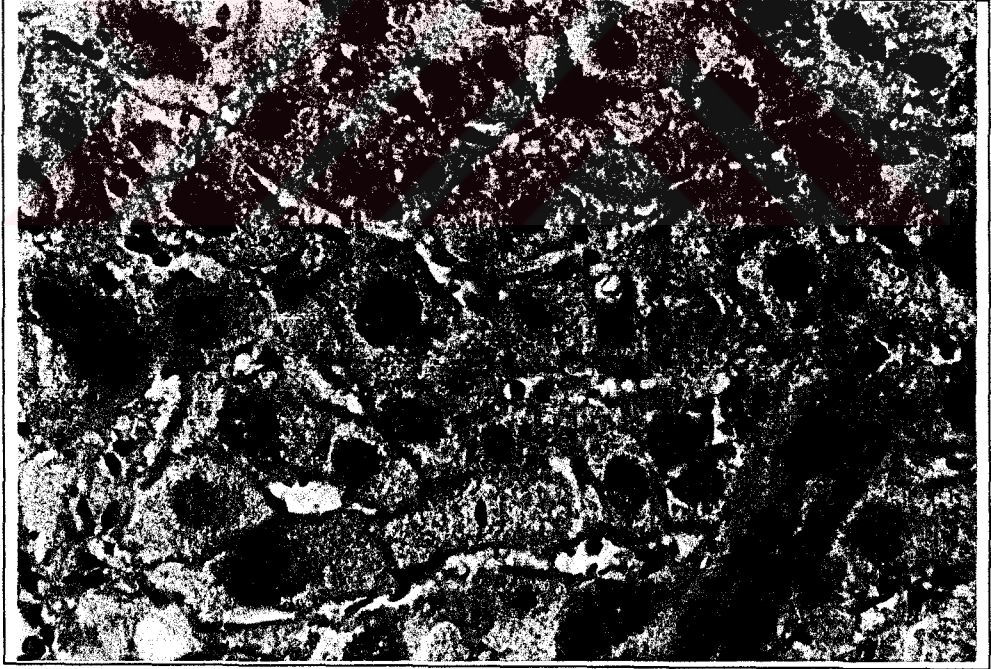
Displastik hücreler, KAH ve KAHS olgularında PCNA ile pozitif reaksiyon vermedi (Resim 16-17), HCC bulunan siroz grubunda ise sadece iki olguda pozitif olarak bulundu (Resim18-19).



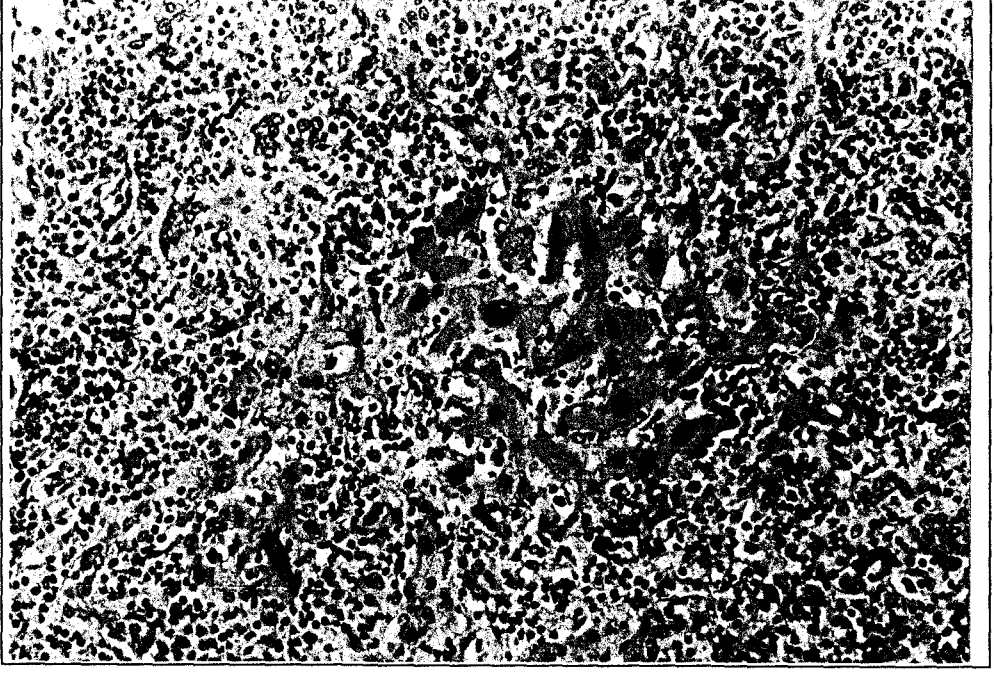
Resim-16: Derece 1 tanısı alan bir KAH olgusunda displastik hücrelerde anti-PCNA ile boyanma izlenmemesine karşın, çevrede PCNA pozitif hücreler dikkati çekmektedir (Anti-PCNA, LSAB x40)



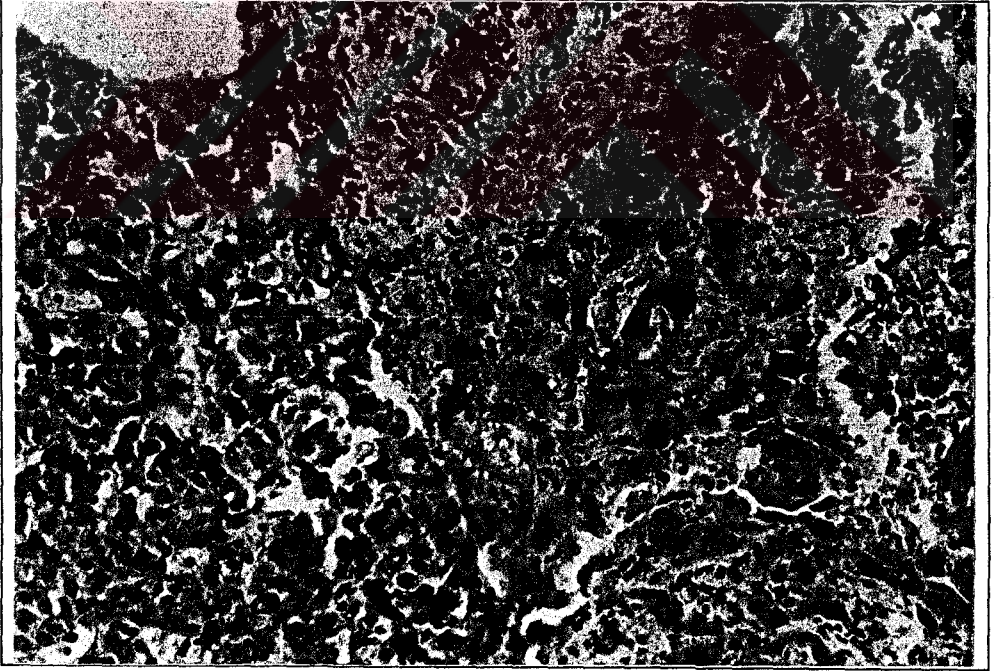
Resim-17: Derece 2 displazi tanısı alan bir KAHS olgusunda soldaki rejenerere hücrelerde belirgin PCNA pozitifliğine karşın sağdaki displazik hücrelerde boyanma izlenmemekte (Anti-PCNA, LSAB x10)



Resim-18: HCC içeren siroz grubundan bir olguda displazik hücrelerde PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x40).



Resim-19: Yangısal aktivitenin çok yüksek olduğu bir HCC içeren siroz olgusunda displazik hücrelerde PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x20).



Resim-20: Resim 19'daki olgunun bir diğer alanında tümöre komđu displastik hücrelerde PCNA pozitifliği (Anti-PCNA, LSAB x20)

Histopatolojik Bulgularla PCNA İndeksinin Korelasyonu:

Tanılara bakılmaksızın olguların multinükleasyon değerleri ile PCNA indeksleri arasındaki bağıntı araştırıldı fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Her üç tanı grubu içinde, sadece KAH grubunda multinükleasyon değerleri PCNA indeksi ile pozitif korelasyon gösterdi ($r: 0.45; p < 0.05$).

Nükleer hiperkromazi içeren ve içermeyen olgular arasında PCNA indeksi açısından farklılık saptanmadı.

Tanılara bakılmaksızın polimorfizm olup olmamasına göre olguların PCNA indekslerine baktığımızda farklılık saptandı. ($SD:1/58; F:5.24; p < 0.05$).

Tüm olgular içinde rozet yapıları içeren 14 olgu ile, içermeyen 46 olgunun PCNA indeksi açısından karşılaştırılmasında iki grup arasında farklılık saptandı. ($SD:1.58; F: 4.19; p < 0.05$). Tanılar göz önüne alınarak her üç grupta aynı karşılaştırma yapıldığında ise rozet formasyonları ile PCNA indeksleri arasında farklılık saptanmadı.

TARTIŞMA

Hücre kinetiği araştırmaları, çeşitli dokularda DNA içine nükleotid yerleştirme çalışmaları (örneğin Timidin, Bromodeoksiüridin) ve hücre proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan immünohistokimyasal yöntemler, hücre proliferasyonunu, zedelenmeden sonra doku onarımını ve malignitenin başlamasını anlamada önemli yardımcılar olmuşlardır. Bunlar içinde immünohistokimyasal yöntemlerin, hasta için toksisite riski taşımamaları, diğer tekniklere oranla daha basit ve hızlı olmaları ve doku bütünlüğünün korunmuş olması gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlardan Ki-67 ve DNA polimeraz alfa taze dokuda çalışma zorunluluğu getirirken; PCNA, formalinle tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda kullanılabilme üstünlüğüne sahiptir ve retrospektif çalışmalara olanak tanımaktadır.

PCNA, DNA replikasyonu ve onarımı için esansiyal olan 36 kDa ağırlığında bir nükleus proteindir. DNA'ya bağlanarak, DNA polimerazların etki etmesine yardımcı olur^(6-9,12,45,46,60,62). PCNA'nin parafin kesitlerde immüno lokalizasyonu, çeşitli normal ve neoplastik dokularda hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılagelmiştir. Normal dokulardaki PCNA ekspresyonu proliferasyon potansiyelini iyi yansıtmakla birlikte, neoplazmlarda daha karmaşık ekspresyon biçimleri ile karşılaşılmıştır^(20,32,35,58). Bu durum, bu hücrelerde DNA hasarı ve onarımının oranının yükselmiş olmasına ve/veya büyüme faktörü yapımının düzenlenmesinin değişmiş olmasına bağlanmaktadır ⁽⁴⁶⁾.

Bu alışmada HBV enfeksiyonuna bağlı kronik hastalıklarda, PCNA ile belirlenen proliferatif aktivitenin, hastalığın değişik evrelerindeki durumu yanısıra, PCNA pozitifliği ile rejenerasyonun histopatolojik bulguları ve

displazik değişiklikler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmaya alınan üç tanı grubundaki (KAH, KAHS ve HCC içeren siroz) PCNA indeksleri HCC dokusunda en yüksek bulunmuştur. Bunu azalan PCNA indeksi değerine göre sırasıyla HCC'a eşlik eden siroz, KAH ve KAHS izlemektedir. Benzer tanı gruplarında, çeşitli araştırmacılarca elde edilen PCNA indeksleri, kullanılan antikorların dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri Tablo 5'te gösterilmiştir. Tablodan da izlenebildiği gibi, PCNA ile yapılan karaciğer çalışmalarında kullanılmış olan PCNA klonu, dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri oldukça farklılık göstermektedir. Aynı PCNA klonunun (PC10) kullanılmış olduğu çalışmalar arasında bile inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları açısından büyük farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin Ojanguren, Nakamura ve Harrison^(37,63,66), PC10'u önerilen dilüsyon oranının çok üstünde kullanmışlardır ve inkübasyon süreleri açısından da büyük farklılıklar bulunmaktadır. Kronik karaciğer hastalıkları dışındaki karaciğer çalışmalarında ise, PC10'un daha düşük dilüsyonlarda kullanıldığı dikkati çekmiştir. Örneğin Koukoulis ve arkadaşları⁽⁵⁵⁾, submassif karaciğer nekrozundan sonra rejenere olan hücreleri göstermek için PC10'u 1:200 dilüsyonda, bir saat oda ısısında inkübe ederek kullanmışlardır. Theocharis ve arkadaşları ise⁽⁸²⁾, parsiyel hepatektomiden sonra rejenere olan sıçan karaciğerindeki PCNA ekspresyonunu, PC10 klonunu 1:150 dilüsyonda ve bir saat inkübe ederek değerlendirmişlerdir. PC10 ile hücre proliferasyonunu kantitatif olarak göstermeye yönelik immünohistokimyasal çalışmalarda bu tip sorunlarla sık karşılaşıldığı için, McCormick ve arkadaşları⁽⁶¹⁾, hücre proliferasyonu ile birlikte olan antijenlerin immünohistokimyasal olarak gösterilmesinde pozitif boyanan hücrelerin sayısı ile uygulanan antikor dilüsyonunun ilişkisini araştırmışlardır. PC10'un da dahil olduğu bir grup

Araştirmacı	Antikor	Dilüsyon ve inkübasyon	PCNA İndeksi Kr. Hepatit	PCNA İndeksi Siroz	PCNA İndeksi Siroz+HCC	PCNA İ. Normal
Kawakita, 1992	19F4	1:200 4C Tüm gece	249±139.9	170±74.0	242.2±136.7	-
Kawakita, 1992	19F4	5mg/ml 22 st, oda ısı	64.0±34.6	40.7±19.3	55.6±49.8	-
Ojanguren, 1993	PC10	1:30 22 st, oda ısı	-	%54'ünde yok %46'ında %5'in altında	İyi dif: %76.92: %5-25 % 23.07: %26-50 Orta dif: %50: %26-50 %50: %51-75 Kötü dif: %50: %51-75 %50: %76-100	%5'ten az
Nakamura, 1993	PC10	1:15, ink:?	%3.5'in üstünde	-	-	-
Harrison, 1993	PC10	1:25 , 30 dk oda ısı	2 Olgu : %10-40 11 olgu : %40'in üstünde	-	-	%1-40
Yılmaz, 1994	PC10	1:80, 1st oda ısı	191.4±48.3	167±35.8	248.5±63.04 410.2±109.7	25±

Tablo 5: Kronik hepatit, siroz ve HCC içeren siroz olgularında kullanılan antikorlar ve PCNA indeksleri

immünohistokimyasal proliferasyon belirleyicisi için, boyanan hücre sayısının azalan antikör konsantrasyonu ile arttığını göstermişlerdir. Araştırmalarda PC10'un 1:30 dilüsyonda kullanılmasıyla elde edilen düşük PCNA indeksleri olasılıkla buna bağlıdır⁽⁶⁶⁾.

Bu karmaşık teknik sorunlara rağmen dikkati çeken bir özellik, tüm çalışmalarda PCNA indeksinin kronik hepatit grubunda daha yüksek, siroz grubunda daha düşük oluşudur. Bizim çalışmamız dışındaki çalışmalarda, HCC içeren siroz grubunda siroz dokusu ve tümör dokusunun değerleri ayrı ayrı belirtilmemiştir. Belirtilen değerlerin de hangi dokuya ait olduğu da vurgulanmamıştır. Kawakita'nın her iki çalışmasında da^(49,50), HCC içeren siroz grubunun değerleri kronik hepatit ve siroz gruplarının değerlerinden daha düşüktür, bu ise beklenen bir sonuç değildir. Ojanguren'in⁽⁶⁶⁾ çalışmasında ise, tümör grubunun değerleri bizim çalışmamızda olduğu gibi kronik hepatit grubundan belirgin şekilde yüksektir.

Karaciğer dokusunda DNA polimeraz alfa ile yapılan bir çalışma ile sonuçlarımızın karşılaştırılması Tablo 6'da izlenmektedir⁽⁷⁴⁾.

Tablo -6: Karaciğerde DNA polimeraz alfa (DPA) ile yapılan bir çalışma ile sonuçlarımızın karşılaştırılması.

Araştırmacı	Antikör	Kronik Hepatit	Siroz	HCC+Siroz
Seki, 1990	DPA	52+56	38+41	99+70
Yılmaz, 1994	PCNA	191.40+48.31	167.95+35.81	410.20+109.74

Her iki çalışmada da, en yüksek proliferasyon indeksi tümör grubunda bulunmuştur, bunu kronik hepatit ve siroz izlemektedir. Bu çalışmada tümöre komşu siroz dokusunun proliferasyon indeksi belirlenmemiş olduğu için, bizim değerimizle (248.5 ± 63.04) bir karşılaştırma yapılamamıştır. PCNA değerlerinin, DPA değerlerine göre yüksek oluşu ise olasılıkla PCNA'nın yarı ömrünün daha uzun oluşuna ve hücre siklusunu henüz terketmiş bazı hücrelerin de pozitiflik vermesine bağlıdır. DPA ile yapılan bu çalışmada, etyolojik ajan non A- non B virusu olarak bildirilmiştir ve gruplara göre proliferasyon indeksinin dağılımı bizim sonuçlarımızla paralellik göstermiştir.

Nakamura⁽⁶³⁾ ve bizim çalışmamız dışında, PCNA'nın kullanıldığı karaciğer çalışmalarının hiçbirinde kronik karaciğer hastalığının etyolojisi belirtilmemiştir. Sayısal değerler açısından izlenen farklılığın bir nedeni de olasılıkla budur, çünkü farklı etyolojilere bağlı karaciğer hastalıklarında, karaciğer rejenerasyonunun hızı farklı olabilmektedir.

Sayısal değerler açısından farklılık bulunsa da, PCNA ile yapılan tüm çalışmalarda, kronik hepatit, siroz ve HCC gruplarında pozitif hücrelerin dağılım paterni benzerdir. Farklı yoğunluklarda PCNA pozitifliği tüm çalışmalarda bildirilmiştir ve olasılıkla farklı hücre siklusu fazlarındaki farklı miktarlardaki PCNA düzeylerini yansıtmaktadır.

Bizim KAH'te yoğunluklu olarak aktif inflamasyon alanlarının çevresinde gözlediğimiz pozitiflik diğer çalışmalarda da bildirilmektedir^(49,50,63,66). Benzer şekilde siroz olgularındaki düzensiz dağılım da vurgulanmıştır. Boyanma yoğunluğunun değişkenliği ve PCNA pozitif hücrelerin lokalizasyonlarına benzer lokalizasyonlar DPA ile de bildirilmiştir⁽⁷⁴⁾.

PCNA teknik zorluklar taşıması, yarı ömrünün uzun olması nedeniyle bazı sorunlar içerse de, karaciğerdeki hücre proliferasyonunu değerlendirmeye yönelik çalışmalarda kullanılmakta ve değerli bilgiler vermektedir. Sıçan

karaciğerinde parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunun değerlendirilmesinde; DNA sentezi, timidin kinaz aktivitesi ve PC10 değerleri arasında sıkı bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir ve PCNA immüno lokalizasyonunun, karaciğer rejenerasyonundaki hücre proliferasyonunun basit ve güvenilir bir indeksi olarak kabul edilebileceği vurgulanmaktadır⁽⁸²⁾.

Bu bulgulardan yola çıkarak, olgularımızda izlediğimiz rejenerasyonun histopatolojik bulguları ile PCNA indeksi arasında bir korelasyon olup olmadığı sorunu ortaya çıkmıştır.

Bildiğimiz gibi rejenerasyonun histopatolojik bulgularından kordonsal düzen bozukluğu ve kalınlaşma, rejenerasyondan yaklaşık bir iki ay sonra kalabilir. Sitolojik değişiklikler (multinükleasyon, nükleer hiperkromazi, nükleer polimorfizm) ise daha uzun süre kalabilmektedir, bu nedenle histopatolojik olarak aktif rejenerasyonu değerlendirmek zordur. PCNA ise yarı ömrü 20 saat olduğu için, hücreler siklustan çıktıktan bir süre sonra da pozitiflik vermekle birlikte aktif hücre proliferasyonunu göstermektedir. Binükleer hepatositlerin PCNA pozitifliği, Parsiyel hepatektomi yapılan sıçanlardaki karaciğer rejenerasyonu sırasında da bildirilmiştir⁽⁸²⁾. Bu bulgular histolojik kriterlerle karaciğerin proliferatif durumu arasındaki korelasyonu ima etmektedir.

Olgularımızın değerlendirilmesi sırasında, multinükleer yada binükleer hepatositlerin ve rozet yapılarının genellikle PCNA pozitifliği gösterdiği bizim de dikkatimizi çekmiştir. Multinükleasyon değerlerini tanılara bakılmaksızın PCNA indeksleri ile karşılaştırdığımızda ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sadece KAH grubunda multinükleasyon değerleri PCNA indeksi ile pozitif korelasyon göstermiştir. Sirozlu olgularda, multinükleer hücreler olasılıkla daha önceden geçirilmiş rejenerasyon evrelerinden kalmış olabileceği için PCNA indeksi ile korelasyon göstermemiştir.

Nükleer polimorfizm ile Rozet oluşumları, tanılara bakılmaksızın PCNA indeksleri ile karşılaştırıldığında, nükleer polimorfizmin ve rozet oluşumlarının varlığının yüksek PCNA indeksleri ile birlikte olduğu bulunmuştur. Nükleer hiperkromazi ile PCNA indeksi arasında ise korelasyon gösterilememiştir.

Bu bulguların ışığında elde ettiğimiz sonuç şudur; kronik HBV enfeksiyonunun KAH evresi, KAHS evresine oranla proliferasyonun daha yüksek olduğu bir evredir ve bu dönemde izlenen, birden çok nükleus içeren hepatositler aktif proliferasyonun bir yansımasını oluşturmaktadır. Olay siroza doğru ilerledikçe, hepatosit proliferasyonunda bir azalma olmakta ve PCNA indeksi düşme göstermektedir. Siroz zemininde HCC gelişen olgulardaki sirotik dokuda ise PCNA indeksleri belirgin şekilde yüksektir. Tüm olgularda, tanıdan bağımsız olarak PCNA indeksleri ile korelasyon gösteren histopatolojik bulgular ise polimorfizm ve rozet yapılarının oluşumudur.

Bugün için kronik zedelenmede, hepatositlerin proliferatif aktivitesini hangi faktörlerin kontrol ettiği çok iyi bilinmemekle birlikte, aktive olmuş Kupffer hücrelerince sentez edilen yada fibrogenesis ve /veya virusa karşı gelişen immünolojik yanıt sırasında ortaya çıkan bazı büyüme faktörleri (EGF, TGF-alfa ve Hepatosit Büyüme Faktörü) ile sitokinlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Belirli bir rejenerasyon evresinden sonra da TGF-beta'nın etkisiyle rejenerasyon durmaktadır. Öte yandan PDGF, FGF, TGF-alfa, EGF gibi çeşitli büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinlerin (İnterlökin-2) dokularda PCNA ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (7,35,78). Kronik HBV enfeksiyonu sırasında PCNA düzeylerinde izlenen oynamalar da olasılıkla bu büyüme faktörlerinin etkisiyle olmaktadır. HCC içeren siroz olgularında PCNA indeksinin yüksek oluşunda da tümör hücrelerince sentezlenen büyüme faktörlerinin rolü olabilir.

Olgularımızda incelediğimiz ve PCNA indeksleri ile korelasyonunu araştırdığımız bir diğer bulgu da Hepatosellüler displazidir. Hepatosellüler displazinin preneoplastik önemi henüz çok iyi aydınlatılmamış olmakla birlikte HCC ve siroz ile sık olarak birlikte bulunmaktadır. Displazi, HCC ve siroz içermeyen kronik HBV enfeksiyonu olgularında %20, HBV enfeksiyonuna bağlı siroz olgularında %20-40, HCC içeren siroz olgularında % 64- 80 oranında bildirilmektedir^(2,4,16,48,68,69). Bu oranlar bizim displazi değerlerimizle uyumludur. Derece 1, 2 ve 3 displazi olgularının oranı, çalışmamızın KAH grubunda %20, KAHS grubunda % 25 ve HCC içeren siroz grubunda % 55'tir. Displazi için esas diagnostik kabul edilen Derece 2 ve 3, HCC içeren siroz grubunda daha yüksek olmakla birlikte bu istatistiksel bir anlam taşımamaktadır.

PCNA ekspresyonu normal ve neoplastik dokular yanısıra displastik lezyonlarda da araştırılmıştır. Midenin displastik glandlarında, PCNA indeksi hiperplastik veya normal glandlara oranla daha yüksek bulunmuş ayrıca anti-PCNA ile reaksiyon veren hücrelerin, normal proliferasyon zonundan daha yukarılara doğru kaydığı izlenmiştir⁽²⁷⁾. Benzer şekilde mesanenin displastik lezyonlarında da PCNA ile yaygın pozitiflik gösterilmiştir⁽⁵³⁾. Bizim olgularımızda ise HCC içeren siroz grubunda iki olguda displastik hücrelerde PCNA pozitifliği saptanmış olmakla birlikte, diğer olgularda ve KAH ile KAHS grubundaki displastik hücrelerde saptanmamıştır. Ayrıca olgularımızda, displazik değişikliklerin varlığı ile PCNA indeksi arasında bir korelasyon gösterilememiştir.

Karaciğer hücre displazisinin premalign olduğunu destekleyen veya buna karşı çıkan veriler bulunmaktadır. Lezyon, HCC'a predispozisyon yaratan iki ana faktör olan siroz ve HBV enfeksiyonu ile kuvvetli bir beraberlik göstermektedir. Sirozdan displaziye ve karsinoma giden kronolojik dizilim bazı çalışmalarda gösterilmişken bazılarında gösterilememiştir^(4,16).

HCC'li hastalarda, karaciğer dokusunda HBV-DNA integrasyonunun araştırılması, displazi gösteren non-tümöral karaciğer dokusunda hepatositlerin klonal artışını ortaya koymuştur⁽⁸⁵⁾. HCC nedeniyle karaciğer rezeksiyonu yapılan olgularda, rezeksiyon materyalinin tümöral olmayan alanlarından elde edilen doku örneklerinde, flow sitometrik DNA ve hücre siklusu incelemeleriyle karaciğer dokusunun proliferatif kapasitesi araştırılmıştır. Hepatosellüler displazi bulunan olgularda G2/M fraksiyonu ile proliferatif kapasitede, displazi içermeyen gruba göre belirgin ve anlamlı bir artış gösterilmiştir ve olguların yaklaşık %40'ında anöploidi gösteren anormal DNA içeriği saptanmıştır. (15,84).

Displastik hücreler HCC ile belirli morfometrik benzerlikler göstermektedir. Fenotipik olarak ise hücreler malign hepatositlerden çok normal hepatositlere benzemektedir. Karyometrik incelemelerde, hepatosellüler displazinin prekanseröz olmadığını ortaya koyan sonuçlar elde edilmiştir (38,86,88). Hepatosellüler displazinin prekanseröz olmadığını düşünen yazarların bir kısmı bunun yaşa bağlı bir değişiklik olabileceğini vurgulamaktadırlar⁽³⁸⁾. Bizim olgularımızda displazi ile yaş arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgular bizi daha çok, displazinin prekanseröz bir lezyon olmayıp, olasılıkla kronik viral enfeksiyon sırasında ortaya çıkan dejeneratif değişiklikleri yansıttığını savunan yazarların görüşüne katılmaya itmiştir (18,31,86,88).

SONUÇLAR

HBV'na bağlı KAH, KAHS ve siroz zemininde gelişmiş HCC olgularında, PCNA indeksi ile rejenerasyonun histopatolojik bulguları ve displazik değişiklikler arasındaki korelasyonu kurma amacı taşıyan çalışmamızda;

* Ortalama yaş KAH'te 38.65, KAHS'da 43.65, HCC içeren siroz'da ise 56.75 olup, HCC içeren siroz grubunun diğer gruplara göre anlamlı şekilde yaşlı olduğu bulundu.

* Rejenerasyonun histopatolojik bulgularından multinükleasyon, KAHS ve HCC içeren siroz grubunda anlamlı şekilde yüksek bulundu. Nükleer hiperkromazi açısından her üç tanı grubu arasında farklılık saptanmadı. Polimorfizm, HCC içeren siroz grubunda diğer gruplara oranla anlamlı şekilde yüksekti. Rozet formasyonları ise KAHS ve HCC içeren siroz grubunda, KAH'e oranla yüksek bulundu.

* Rejenerasyonun histopatolojik bulguları ile PCNA indeksi arasındaki korelasyon araştırıldığında ise; rozet oluşumları ve polimorfizmin, tanıdan bağımsız olarak yüksek PCNA indeksleri ile birlikte olduğu saptandı. Multinükleasyon sadece KAH grubunda yüksek PCNA indeksleri ile korelasyon gösterdi.

* Hepatosellüler displazi, KAH'te %20, KAHS'da %25 ve HCC içeren siroz grubunda %55 oranında bulundu. HCC içeren siroz grubunda displazi oranı yüksekti ancak bunun istatistiksel bir önemi yoktu. Hepatosellüler displazi varlığı ile PCNA indeksleri arasında da bir korelasyon gösterilemedi. Displazik hücreler, sadece HCC içeren siroz grubunda iki olgu da PCNA pozitif idi.

Bu bulgular ışığında, hepatosellüler displazinin prekanseröz olmadığı görüşüne varıldı.

* PCNA indeksi KAH'te 191.40 ± 48.31 , KAHS'da 167.95 ± 35.81 , HCC içeren siroz olgularının siroz dokusunda 248.50 ± 63.04 , tümör dokusunda ise 410.20 ± 109.74 olarak saptandı. HCC içeren siroz grubunda hem tümör dokusunun, hem de siroz dokusunun PCNA indeksi diğer gruplara oranla anlamlı şekilde yüksek bulundu. PCNA pozitif hücrelerin oranı şu sırayı izleyerek azalmaktaydı; HCC içeren siroz (Tümör alanları) > HCC içeren siroz (Siroz alanları) > KAH > KAHS. KAH'te PCNA pozitifliği aktif inflamasyon alanlarının çevresinde lokalize olurken, KAHS'ndaki nodüllerde daha düzensiz ama yine de inflamasyonla paralel bir dağılım gösterdi. HCC içeren siroz olgularındaki siroz nodüllerinde daha yaygın ve kuvvetli pozitiflik dikkati çekti, tümör dokusunda ise tümör adaları içinde odaklar halinde PCNA pozitif hücre grupları izlendi.

PCNA'nin teknik zorluklar taşıması, yarı ömrünün uzun oluşu gibi bazı dezavantajları bulunmakla birlikte, KAH'te PCNA indeksinin düşmesinin siroza gidişi, sirozda PCNA indeksinin tekrar yükselmesinin ise HCC gelişimini önceden belirlemede faydalı olabileceği sonucuna varıldı. Özellikle HBV markerları pozitif siroz söz konusu olduğunda, PCNA indeksinin yüksek olduğu olgularda, var olan veya ortaya çıkması olası HCC'ü belirlemede karaciğer görüntüleme yöntemleri ya da serum alfa fetoprotein ölçümleri ile klinik izlem önerilebilir.

ÖZET

PCNA, düzeyleri S fazı sırasında maksimuma ulaşan, DNA replikasyonu ve onarımı için gerekli olan bir nukleus proteindir, formalinle tespit edilmiş parafine gömülmüş dokularda PC10 antikoru ile gösterilebilir. Bu çalışmada, EÜTF'de, HBV enfeksiyonuna bağlı KAH, KAHS ve Siroz zemininde gelişen HCC tanısı almış olan 20'şer olguya ait karaciğer biyopsi materyalleri, histopatolojik rejenerasyon ve displazi bulguları yanısıra LSAB tekniği ile PC10 immünoreaktivitesi açısından incelendi. Tüm doku örnekleri formalinle tespit edilip parafine gömülmüş olup, olgularda HBV belirleyicileri serumda veya dokuda gösterildi. On olguda, ek olarak HCV enfeksiyonu saptandı.

Rejenerasyonun histopatolojik bulgularından multinükleasyon ve rozet yapıları oluşumu, KAHS ve HCC içeren siroz grubunda; polimorfizm ise HCC içeren siroz grubunda anlamlı şekilde yüksek bulundu.

Hepatosellüler displazi KAH'te %25, KAHS'nda %50, HCC içeren sirozda %55 oranında saptandı. Displazik değişikliklerin varlığı ile PCNA indeksi arasında korelasyon saptanmadı.

Olgularda ortalama PCNA indeksleri şu sırayı izlemekteydi; HCC> HCC'a komşu siroz dokusu> KAH>KAHS. HCC içeren siroz grubunda hem tümör dokusunun, hem de siroz dokusunun PCNA indeksleri diğer gruplardan anlamlı şekilde farklıydı. Rejenerasyon bulgularından multinükleasyon sadece KAH'te, yüksek PCNA indeksi ile korelasyon gösterdi. Polimorfizm ve rozet yapıları ise tanılara bakılmaksızın yüksek PCNA indeksi ile korelasyon gösterdi. HCV enfeksiyonu varlığı ile PCNA indeksi arasında korelasyon saptanmadı.

Sonuç: * PCNA indeksi kronik HBV enfeksiyonu olan olguların izleminde yararlı sonuçlar verebilir.

** Hepatosellüler displazi preneoplastik bir lezyondan çok viral enfeksiyona özgü dejeneratif bir değişiklidir.

(Anahtar Kelimeler: Karaciğer, İmmünohistokimya, Hücre proliferasyonu, HBV, Displazi, PCNA.)



KAYNAKLAR:

- 1- Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GI, Veronese S, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchow Archiv A Pathol Anat* 419: 416- 423, 1991.
- 2- Akagi G, Furuya K, Kanamura T, Chihara H, ve ark. Liver cell dysplasia and hepatitis b surface antigen in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Cancer* 54: 315- 318, 1984.
- 3- Amin MB, Ma CK, Linden MD, Kubus JJ, ve ark. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 100: 428- 432, 1993.
- 4- Anthony PP, Vogel CL, Barker LF: Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 26: 217- 223, 1973.
- 5- Benbrook D, Lernhart E, Pfahl MJ. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333: 669- 672, 1988.
- 6- Bravo R, Macdonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 4: 655- 661, 1985.
- 7- Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 163: 287- 293, 1986.
- 8- Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/ proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105: 1549- 1554, 1987.
- 9- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326: 515- 517, 1987.

- 10- Bressac B, Kew M, Wands J, Öztürk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. *Nature* 350: 429- 431, 1991.
- 11- Carey FA, Fabbroni G, Lamb D. Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: a systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* 20: 499- 503, 1992.
- 12- Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ. Cyclin: A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leuk Res* 8: 143- 157, 1984.
- 13- Chang MH, Chen PJ, Chen JY. Hepatitis B virus integration in hepatitis B-virus related hepatocellular carcinoma in childhood. *Hepatology* 13: 316- 320, 1991.
- 14- Chen DS, Hoyer BH, Nelson J, Purcell RH, ve ark. Detection of hepatitis B viral DNA in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2: 42- 45, 1982.
- 15- Chiu JH, Wu L, Kao H, Chang H, ve ark. Can determination of the proliferative capacity of the nontumor portion predict the risk of tumor recurrence in the liver remnant after resection of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 18: 96- 102 ,1993.
- 16- Cohen C, Berson SD. Liver cell dysplasia in normal, cirrhotic and hepatocellular carcinoma patients. *Cancer* 57: 1535- 1538, 1986.
- 17- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1989, 1- 39.
- 18- Crawford JM. Pathologic assesment of liver cell dysplasia and benign liver tumors: Differentiation from malignant tumors. *Sem Diagn Pathol* 7: 115- 128, 1990.
- 19- Dako Corporation. *Special Instructions Dako LSAB Kit System K 689*, California, s: 7.

- 20- Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assesment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 136: 1115- 1124, 1990 .
- 21- Delahunt B, Bethwate PB, Nacey JN, Ribas JL. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with tumor grade, mitotic index, and silver staining nucleolar orginizer region numbers. *J Pathol* 170: 471- 477, 1993.
- 22- Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol* 97 (Suppl 1): S21-S28, 1992.
- 23- Di Bisceglie AM, Rustgi VK, Hoofnagle JM, Dusheiko JM, Lotze MT. Hepatocellular Carcinoma. *Ann Intern Med* 108: 390- 401, 1988.
- 24- Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: Molecular biology of its growth and relationship to Hepatitis B virus infection. *Med Clin North Am* 73: 985- 997, 1989.
- 25- Fausta N, Mead JE: Regulation of liver growth: Protooncogenes and transforming growth factors. *Lab Invest* 60:4-7, 1989.
- 26- Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B x Antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8: 1109- 1117, 1993.
- 27- Filipe MI, Mendes R, Lane DP, Morris RW. Assesment of proliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA. *Histopathology* 22: 349- 354, 1993.
- 28- Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, ve ark. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of

- peripheral, node negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 70: 1520- 1527, 1992.
- 29- Fujise K, Nagamori S, Hasumura S, Homma S, ve ark. Integration of Hepatitis B virus DNA into cells of six established human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepato-gastroenterol* 37: 457- 460, 1990.
- 30- Gerber MA, Thung SN. Molecular and Cellular Pathology of Hepatitis B. *Lab Inves* 52: 572- 590, 1985.
- 31- Giannini A, Zampi G, Bartolini F, Omer St. Morphological precursors of Hepatocellular Carcinoma: A morphometrical analysis. *Hepato-gastroenterology* 34: 95- 97, 1987.
- 32- Gillet CE, Bernes DM, Camplejohn RS. Comparison of three cell cycle associated antigens as markers of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 46: 1126- 1128, 1993.
- 33- Graig JR, Peters RL, Edmondson HA. Atlas of tumor pathology. Second series, Fascicle 26. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1989, 123- 190.
- 34- Haapasalo HK, Sallinen PK, Helen PT, Rantala IS, ve ark. Comparison of three quantitation methods for PCNA immunostaining: Applicability and relation to survival in 83 astrocytic neoplasms. *J Pathol* 171: 207- 214, 1993 .
- 35- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162: 285- 294, 1990.
- 36- Hall PA, Levison DA. Review: Assesment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43: 184- 192, 1990.

- 37- Harrison RF, Reynolds GM, Rowlands DC. Immunohistochemical evidence for the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by non-proliferating hepatocytes adjacent to metastatic tumours and inflammatory conditions. *J Pathol* 171: 115- 122, 1993.
- 38- Henmi A, Uchida T, Shikata T: Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Evidence against the precancerous nature of liver cell dysplasia. *Cancer* 55: 2594- 2599, 1985.
- 39- Hino O, Kitagawa T, Koike K . Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology* 4: 90- 95, 1984.
- 40- Hsu IC, Metcalf RA, Sun TA. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350: 427- 428, 1991.
- 41- Imazeki F, Omata M, Yokusuka O, Okuda K. Integration of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 58: 1055- 1060, 1986.
- 42- Ishida T, Kaneko S, Akazawa K, Tateishi M, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar orginizer regions as factors influencing prognosis of surgically treated lung cancer patients. *Cancer Res* 53: 5000- 5003, 1993.
- 43- Jacyna MR, Millward-Sadler GH, Thomas HC. Chronic hepatitis. In: *Wright's Liver and Biliary Disease*. (Eds: Millward-Sadler GH, Wright R, Arthur MJP). London , W.B. Saunders Company Ltd, 1992, 787- 820.
- 44- Jain S, Filipe MI, Hall PA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) prognostic value in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 44: 655- 659, 1991.
- 45- Jaskulski D, De Riel JK, Mercer WE, Calabretta B, ve ark. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240: 1544- 1546, 1988.

- 46- Jaskulski D, Gatti C, Travali S, Calabretta B, ve ark. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 263: 10175- 10179, 1988.
- 47- Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ, ve ark. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/ Cyclin 19A2. Correlation with Ki-67 labelling. *Am J Pathol* 138: 1471- 1477, 1991.
- 48- Karhunen PJ, Penttila A. Preneoplastik lesions of the human liver. *Hepatogastroenterology* 340: 10- 15, 1987.
- 49- Kawakita N, Seki S, Yanai A, Sakaguchi H, ve ark. Immunohistochemical identification of proliferative hepatocytes using a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin). *Am J Clin Pathol*; 97 (Suppl 1): S14- S20, 1992.
- 50- Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, ve ark. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 140: 513- 520, 1992.
- 51- Kim CM, Koike K, Saito I, Myamura I, ve ark. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351: 317- 320, 1991.
- 52- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, ve ark. Interrelationship of bloodtransfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12: 671- 675, 1990.
- 53- Kneuchel R, Burgau M, Rueschoff J, Hofstaedter F. Proliferating cell nuclear antigen in normal urothelium and urothelial lesions of the

- urinary bladder: a quantitative assessment using a true color image analysis system. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 64: 137- 144)
- 54- Korkolopoulou P, Patsouris E, Pangalis G, Tsenga A, ve ark. A comparative assesment of proliferating cell nuclear antigen, c-myc p62, and nucleolar orginizing region staining in Non-Hodgkin's lymphomas: A histochemical and immunohistochemical study of 200 cases. *Hum Pathol* 24: 371- 377, 1993.
- 55- Koukoulis G, Rayner A, Tan K-C, Williams R, ve ark. Immunolocalisation of regenerating cells after submassive liver necrosis using PCNA staining. *J Pathol* 166: 359- 368, 1992.
- 56- Lau JYN, Alexander GJM, Alberti A. Viral Hepatitis. *Gut (Suppl)* S47-S62, 1991.
- 57- Lee RC. *Diagnostic Liver Pathology*, St Louis, Mosby-Year Book, 1994, 430- 500.
- 58- Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, ve ark. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45: 416- 419, 1992.
- 59- Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, ve ark. Viral pathogenesis of Hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 18: 1326- 1333, 1993.
- 60- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and Cyclin. *Nature* 1984; 309: 374- 376.
- 61- McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistochemical quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 1993; 22: 453- 547.
- 62- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228- 2234, 1978.

- 63- Nakamura T, Hayama M, Sakai T, Hotchi M, ve ark. Proliferative activity of hepatocytes in chronic viral hepatitis as revealed by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Hum Pathol* 24: 750- 753, 1993.
- 64- Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, ve ark. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/Cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 168: 475- 486, 1987.
- 64- Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan EM. Epitopes of proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J Immunol* 139: 2942- 2946, 1987.
- 65- Ogata N, Kamimura T, Asakura H. Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 13: 31- 37, 1991.
- 66- Ojanguren I, Ariza A, Lljatos M, Castella E, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic liver: A fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 24: 905- 908, 1993.
- 67- Pick A, Chiusa L, Margaria E, Aloı F. Proliferative activity in the malignant cellular blue nevus. *Hum Pathol* 24: 1323- 1329, 1993.
- 68- Popper H, Thung SN, Mc Mahon BJ. Evolution of hepatocellular carcinoma associated with chronic hepatitis B virus infection in Alaskan Eskimos. *Arch Pathol Lab Med* 12: 498- 504, 1988.
- 69- Roncalli M, Borzio M, De Biagi G, Ferrari A, ve ark. Liver cell dysplasia in cirrhosis: a serologic and immunohistochemical study. *Cancer* 57: 1515- 1521, 1986.
- 70- Roncalli M, Borzio M, Tombesi MV, Ferrari A, ve ark. A morphometric study of liver cell dysplasia. *Hum Pathol* 19: 471- 474, 1988.

- 71- Saul SH. Masses of Liver. In Diagnostic Surgical Pathology, İkinci baskı, (Ed: Sternberg SS). New York, Raven Press Ltd, 1994, 1517-1580.
- 72- Schirmacher P, Rogler CE, Dienes HP. Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 63: 71- 89, 1993.
- 73- Seifer M, Höhne M, Schaefer S, Gerlich WH. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol* 13: S61- S65, 1991.
- 74- Seki S, Sakaguchi H, Kawakita N, Yanai A, ve ark. Identification and fine structure of proliferating hepatocytes in malignant and non malignant liver diseases by use of a monoclonal antibody against DNA polymerase alpha. *Hum Pathol* 21: 1020- 1030, 1990 .
- 75- Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI et al. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 395: 1067-1073, 1981.
- 76- Sherlock S, Niazi SP, Fox RA. Chronic Liver Disease and primary liver-cell cancer with hepatitis- associated (Australia) antigen in serum. *Lancet* 1:1243-1247, 1970.
- 77- Sheron N, Alexander GJM. Hepatitis C, D and E virus infection. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 4: 749- 773, 1990.
- 78- Shivji MKK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69: 367-374, 1992.
- 79- Slagle BL, Zhou YZ, Butel JS. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 51: 49-54, 1991.

- 80- Smith FG, Murray PG, Crocker J. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 46: 28-31, 1993.
- 81- Takahashi H, Strutton GM, Parson PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti- PCNA/Cyclin monoclonal antibody. *Histopathology* 18:221- 227, 1991.
- 82- Theocharis SE, Skopelitou AS, Margelli AP, Pavlaki KJ, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Dig Dis Sci* 39: 245- 252, 1994.
- 83- Theunissen PHMH, Leers MPG, Bollen ECM. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 20: 251- 255, 1992.
- 84- Thomas RM, Berman JJ, Yetter RA, Moore W, Hutchins GM. Liver cell dysplasia: A DNA aneuploid lesion with distinct morphologic features. *Hum Pathol* 23: 496- 503, 1992.
- 85- Tozuka S, Uchida T, Suzuki K. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with noncarcinomatous liver disease. *Arch Pathol Lab Med* 113: 20- 25, 1989.
- 86- Uchida T, Miyata H, Shikita T. Human hepatocellular carcinoma and putative precancerous disorders: their enzyme histochemical study. *Arch pathol Lab Med* 105: 180- 186, 1981.
- 87- Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Science* 96: 121- 129, 1990.
- 88- Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, ve ark. Morphologic studies of liver cell dysplasia. *Cancer* 51: 1535- 1538, 1983.
- 89- WHO, Global Health Situation and Projections and Estimates 1992. World Health Organization, Geneva, 1992.

- 90- Woods AL, Hall PA, Shephard NA. The assesment of proliferating cell nuclear antigen PCNA immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991; 18: 21-27.
- 91- Wright TL, Venook AP, Millward-Sadler GH. Hepatic Tumors. In: *Wright's Liver and Biliary Disease*. (Eds: Millward-Sadler GH, Arthur MJP). London , W.B. Saunders Company Ltd, 1992, 1079- 1137.
- 92- Yu CC-W, Hall PA, Fletcher CDM, Camplejohn RS, ve ark. Haemangiomapericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology* 19: 29- 33, 1991.
- 93- Yu CC-W, Fletcher CDM, Newman PL, Goodlad JR, ve ark. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar orginizer (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumors. *J Pathol* 166: 147- 152, 1992.