

## Fötal Gelişim Süresince Sığır Karaciğerindeki Sitokeratin 8 ve Sitokeratin 18 Proteinlerinin Dağılımı

Uğur TOPALOĞLU<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.  
<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-8306-491X

Geliş Tarihi: 24.10.2022

Kabul Tarihi: 21.11.2022

**Özet:** Embriyonik gelişimin kontrolünde kritik rol alan sitokeratinler (CK), embriyogenez esnasında epitel hücre gelişiminin değişen aşamalarında farklı keratinler şeklinde ekspres edilir. CK8 ve CK18 proteinleri; çeşitli parankimatöz epitel başta olmak üzere basit epitel hücrelerinin primer keratin çifti olarak bilinmektedirler. Karaciğer; embriyonal dönemde kan yapımı ve kan hacmi regülasyonu, protein sentezi, bağışıklık sistemine katkı, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, metabolitleri depolama, safra salgısı ve detoksifikasyon gibi çok sayıda fizyolojik rollere sahiptir. Bu çalışma; CK8 ve CK18 proteinlerinin sığır fötal karaciğer hücrelerindeki dağılım ve lokalizasyonlarının immunohistokimyasal yolla belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada özel kesimhanelerden temin edilen 27 adet sığır fetüsü kullanıldı. Yaşları belirlenen fetüsler; gebeliğin birinci (69-89 günlük / 9 fetüs), ikinci (99-178 / 9 fetüs) ve üçüncü (190-269 / 9 fetüs) dönemlerine ait olacak şekilde gruplandırıldı. Fetüslerden alınan karaciğer örnekleri 18 saat boyunca %10'luk formol-alkolde tespit edildi. Rutin histolojik prosedürlerden sonra elde edilen kesitlere immunohistokimyasal boyamalar yapıldı. Boyama sonucunda; CK8 ve CK18'in gebelik süresince safra kanalı epitel hücrelerinde çok güçlü seviyede ekspres olduğu görüldü. Bununla birlikte hepatositlerde ise CK8 ve CK18'in gebelik dönemlerine göre değişen yoğunluklarda ekspresyon gösterdikleri belirlendi. Böylece CK8 ve CK18'in; sığır karaciğer gelişiminin kontrolü, hepatositlerin ve safra kanal epitel hücrelerinin bölünmesi, çoğalması ve farklılaşmaları gibi birçok role sahip olabilecekleri düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** CK8, CK18, Fötal karaciğer, Immunohistokimya, Sığır, Sitokeratinler.

### Distribution of Cytokeratin 8 and Cytokeratin 18 Proteins in Bovine Liver During Fetal Development

**Abstract:** Cytokeratins (CK), which play a critical role in the control of embryonic development, are expressed as different keratins at varying stages of epithelial cell development during embryogenesis. The CK8 and CK18 proteins are the primary keratin pair of simple epithelial cells, especially of various parenchymatous epithelium. The liver has many physiological roles, such as blood production and blood volume regulation, protein synthesis, contribution to the immune system, endocrine control of growth signaling pathways, metabolite storage, bile secretion, and detoxification during the embryonal period. This study was conducted to determine the distribution and localization of CK8 and CK18 proteins in bovine fetal liver cells by immunohistochemical method. In the study, 27 bovine fetuses obtained from private slaughterhouses were used. The fetuses whose ages were determined; were grouped as belonging to the first (69-89 days / 9 fetuses), second (99-178 days / 9 fetuses) and third (190-269 days / 9 fetuses) periods of pregnancy. Then, liver tissue samples were taken from the fetuses and fixed in 10% formol-alcohol for 18 hours. The tissue samples were then subjected to routine histological procedures and immunohistochemistry staining. As a result of staining, it was observed that CK8 and CK18 were strongly expressed in bile duct epithelial cells during pregnancy. However, it has been determined that CK8 and CK18 are expressed in hepatocytes with varying densities according to the pregnancy periods. Thus, it was thought that CK8 and CK18 might have many roles, such as controlling the development of the bovine liver, division, proliferation, and differentiation of hepatocytes and bile duct epithelial cells.

**Keywords:** Bovine, CK8, CK18, Cytokeratins, Fetal liver, Immunohistochemistry.

### Giriş

Sitokeratinler (CK), keratin içeren bir ara filament olup genellikle epitel dokusunun intrasitoplazmik hücre iskeletinde bulunmaktadırlar. Ara filament proteinlerinin tanımlandığı 1970'lerde sitokeratin (CK) olarak kullanılan terim, 2006'daki yeni sistemik terminolojiye göre sitokeratinler ile birlikte keratinler (k) olarak da kullanılmaya başlanmıştır (Kumar ve Jagannatha, 2018). Sitokeratinler kendi içerisinde; yüksek moleküler ağırlıklı veya bazık sitokeratinler (CK/K 1-9) ve düşük moleküler ağırlıklı

veya asidik sitokeratinler (CK/K 10-20) şeklinde gruplandırılmıştır (Moll ve ark., 1982). Sitokeratinler her organa özel olacak şekilde ekspres edilirken, bir epitel hücresinde ekspres olan sitokeratinlerin alt üyeleri epitel tipine ve farklılaşma modeline göre değişkenlik gösterebilir. Bununla birlikte sitokeratinlerin en dikkat çekici tarafı ise herhangi bir epitel dokusunda görülen sitokeratinin aynı gruptakilerden en az biri ile her zaman birlikte ekspres olmasıdır (Kumar ve Jagannatha, 2018).

Embriyonik gelişimin kontrolünde rol alan sitokeratinler, embriyogenez esnasında epitel hücre gelişiminin değişen aşamalarında farklı keratinler şeklinde ekspresse edilir (Kumar ve Jagannatha, 2018; Steinert ve ark., 1993).

Genelde birlikte ekspresse olduğu ifade edilen CK8 ve CK18 proteinleri; çeşitli parankimatöz epitel başta olmak üzere basit epitel hücrelerinin primer keratin çifti olarak bilinmektedirler. Bununla birlikte bu proteinlerin; embriyogenezde, embriyonun ilk oluşum anında ortaya çıktıkları ve filogenez sırasında en eski keratinler olarak görüldükleri de ifade edilmiştir. CK8 ve CK18; kanal kaplayan hücreler, bağırsak ve mezotel hücreleri gibi basit, tek katmanlı epitel hücrelerinin birincil hücre iskeleti proteinleridir (Kumar ve Jagannatha, 2018; Liao ve ark., 1995). Yine keratin 8 (K8) ve keratin 18'in (K18), spesifik olarak hepatositlerde ekspresse edilen başlıca ara filament proteinleri olduğu ve bu proteinlerin hücrelerde sitozol boyunca yayılarak mekanik olarak destek sağladığı belirtilmiştir (Pan ve ark., 2013; Strnad ve ark., 2012; Toivola ve ark., 2015). Ayrıca CK8 / CK18, sinyalleme yapısal desteği ve düzenlenmesi yoluyla hepatositleri koruduğu da ifade edilmiştir (Lim ve Ku, 2021).

Vücudun en büyük bezi olarak tanımlanan karaciğer hem ekzokrin hem de endokrin kısımlardan meydana gelir. Karaciğerin ekzokrin olarak ifade edilen kısmı safrayı, endokrin kısmı ise glikojenden ve bazı plazma proteinlerinden glikoz gibi kimyasal maddeler salgılar (Michalopoulos, 2007; Naik ve ark., 2020; Subhaana ve ark., 2020). Bu metabolik görevlerinin yanı sıra karaciğerin yetişkinlerde sindirim ve bağışıklık başta olmak üzere birçok fizyolojik sürece pozitif anlamda etki ettiği bildirilmiştir. Ayrıca karaciğerin canlılarda özellikle metabolizma ile ilgili olarak embriyonal dönemde kan yapımı ve kan hacmi regülasyonu, protein sentezi, bağışıklık sistemine katkı, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, metabolitleri depolama, safra salgısı ve detoksifikasyon gibi çok sayıda fizyolojik rolere sahip olduğunda ifade edilmiştir (Akiyoshi ve Inoue, 2012; Trefts ve ark., 2017). Karaciğer farklı embriyolojik hücre tiplerinden (hepatositler, biliyer epitel hücreleri (kolanjiyositler), stellate hücreleri, Kupffer hücreleri ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri) oluşur. Bu hücre tiplerinin her biri, karaciğer fonksiyonunu iş birliği içinde kontrol eden eşsiz görevlere sahiptir. Karaciğerin birincil epitel hücre popülasyonu olan hepatositler, karaciğer hacminin çoğunu (%60') oluşturur ve birçok işlevi yerine getirirler. Hepatositlerin, besinlerin taşınması, fetal büyüme ve gelişimdeki kritik düzenleyici hücreler olduğu gösterilmiştir. (Ham ve ark., 1979; Naik ve ark., 2020; Trefts ve ark., 2017).

Sunulan çalışma; epitel hücrelerin ve hepatositlerin yapısına katıldığı belirtilen CK8 ve CK18 proteinlerinin sığır fetal karaciğer hücrelerindeki dağılım ve lokalizasyonlarını immunohistokimyasal yöntemle belirlemek amacı ile yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

**Materyal Temini ve Doku Hazırlama:** Sunulan araştırmada özel kesimhanelerden temin edilen gebeliğin farklı dönemlerine ait ve klinik olarak sağlıklı 27 adet fetüs kullanıldı. Alınan fetüslerin yaş tayinleri; alın-sağrı uzunluğu (Crown-Rump Length; CRL) ölçümüne dayalı olan, "y:54,6 cm+2,46(x) cm" eşitliği kullanılarak belirlendi. Uygulanan bu formülasyona göre "x" alın-sağrı uzunluğunu, "y" ise fetal yaşı gün cinsinden göstermektedir (Harris ve ark. 1983). Yaşları belirlenen fetüsler; gebeliğin birinci (69-89 günlük / 9 fetüs), ikinci (99-178 / 9 fetüs) ve üçüncü (190-269 / 9 fetüs) dönemlerine ait olacak şekilde gruplandırıldı. Bu gruplandırma dikkate alınarak tüm fetüslerden karaciğer doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri tespit edilmek amacı ile 18 saat boyunca %10'luk formol-alkole tabi tutuldu. Ardından dereceli alkol serilerinde dehidre edildi. Dehidre edilen doku örnekleri daha sonra metilbenzoat, benzol ve benzol-paraplast serilerinden geçirilerek parafin blokları haline getirildi. Ardından parafine gömülmüş doku örneklerinden rotary mikrotomunda (Leica RM-2125, Germany) 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler immunohistokimya boyaması için önceden APES (3 amino propyl triethoxysilan; Sigma-Aldrich Chemicals, St.Louis, MO, USA) ile kaplı lamlar üzerine alındılar.

Hayvan Deneyleti Etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğin (15.02.2014) 8. maddesinin k bendi 1. fıkrasında belirtildiği üzere çalışmamızda kullandığımız materyal; mezbahe materyali olduğundan HADYEK iznine tabi değildir.

**Immunohistokimyasal Prosedür:** APES ile kaplı lamlara alınan seri kesitler, streptavidin-peroksidaz prosedürü ve Zymed Histostain Plus Bulk Kit (South San Francisco, CA, ABD, cat no: 85-9043) tekniğine uygun olarak immunohistokimya (IHC) boyamasına tabi tutuldu. Öncelikle alınan kesitler kuruması için bekletildi. Bu kurutma işleminden sonra kesitler deparafinizasyon (ksilol ile 5'er dakikadan iki kez) ve rehidrasyon (dereceli alkoller ile 3'er dakika) süreçlerden geçirilerek distile suda yıkanmaya alındı. Daha sonra doku örneklerindeki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacı ile kesitler metanolde hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu içerisinde 20 dk bekletildi ve sonrasında 5'er dk (üç kez) PBS (Phosphate Buffer Saline, pH: 7.4, 0.01 M) çözeltisinde yıkandı. Preperatlar daha sonra

antikoron bağlanacağı antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacı ile sitrat buffer çözeltisinde (pH: 6) 95°C'de 30 dakika boyunca bekletildi ve süre sonunda oda ısısına gelinceye kadar solüsyon içinde bırakıldı. Ardından kesitlerde, primer antikoron spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacı ile bloklayıcı solüsyonda (Ultra V Blok, catalog: TA-125-UB, Thermo Scientific) 15 dk tabi tutuldu ve ardından solüsyonun uzaklaşması sağlanarak kesitler, 1:200 oranında sulandırılmış CK8 (Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin 8, katalog no: ab2530 Abcam) ve CK18 (Mouse Monoclonal Antibody Cytokeratin 18, katalog no: ab668 Abcam) antikorumları ile +4 °C de bir gece reaksiyona tabi tutuldu. Bu işlemin ardından kesitler 5'er dk (üç kez) PBS içerisinde yıkandıktan sonra oda ısısında 20 dk biyotin işaretli sekonder antikorum (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, catalog:TP-125-BN, Thermo Scientific) ile inkübe edildi. Sonrasında 5'er dk (3 kez) PBS içerisinde yıkamayı takiben kesitlere oda ısısında 20 dk süreyle streptavidin peroksidaz (Thermo Fisher Scientific, catalog: TA-125-HR) uygulandı. Son olarak kesitler üzerine 3.3 diaminobenzidin (DAB Substrate, Thermo Scientific, katalog no: TA-125-HD) damlatılarak reaksiyonun şekillenme süresine göre ortalama 5-15 dk bekletildi. Sonrasında distile suda yıkanan kesitler Mayers'in Hematoksilin solüsyonu damlatılarak 2 dk boyunca çekirdeklerin boyanması sağlandı. Ardından akan çeşme suyu altında 5 dk boyunca yıkanan kesitler artan dereceli alkol

serilerinden geçirilerek suyun uzaklaştırılması sağlandı ve ksilol'de parlatıldıktan sonra dokular entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. Boyanan preparatlar DS-RI1 video kamera (DS-U3, Nikon, Tokyo, Japan) ataçmanlı Nikon Eclipse E400 araştırma mikroskopunda (Nikon, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

Yapılan immunohistokimya metodunun doğruluğunu göstermek amacı ile negatif kontroller kullanıldı. Bunun için de alınan karaciğer kesitleri birincil antikorum yerine PBS tamponu ile inkübasyona tabi tutuldu.

**Yarı Kantitatif Değerlendirme:** Immunohistokimyasal boyanmaların değerlendirilmesi yoğunluk skoru (intensity score) üzerinden yapıldı. CK8 ve CK18 ekspresyonları için pozitif reaksiyon gösteren hücreler kalitatif olarak değerlendirildi. Pozitif hücreler boyanma yoğunluklarına göre (-) negatif; (+) zayıf; (++) orta veya (+++) güçlü olmak üzere dört seviyede skorlandı (Devkota ve ark., 2006). Pozitif boyanan hücrelerin değerlendirmelerini birbirinden bağımsız uzman araştırmacılar (U.T ve M.E.A) tarafından yapıldı ve ortalama skorlar hesaplandı. Karaciğer kesitlerinde CK8 ve CK18'in ekspresyonları X40, X100 ve X400 büyütmede incelendi. Karaciğerin her bir bölgesinde, her bir kesit için üç rastgele seçilmiş alan değerlendirildi. Sonuçlar; hepatositler, portal ven, arteria hepatica ve safra kanalı epitel hücreleri olmak üzere ayrı ayrı değerlendirildi (Tablo 1).

**Tablo 1:** CK8 ve CK18'in immunohistokimyasal boyanma yoğunluklarına ait semikantitatif değerlendirmeler.

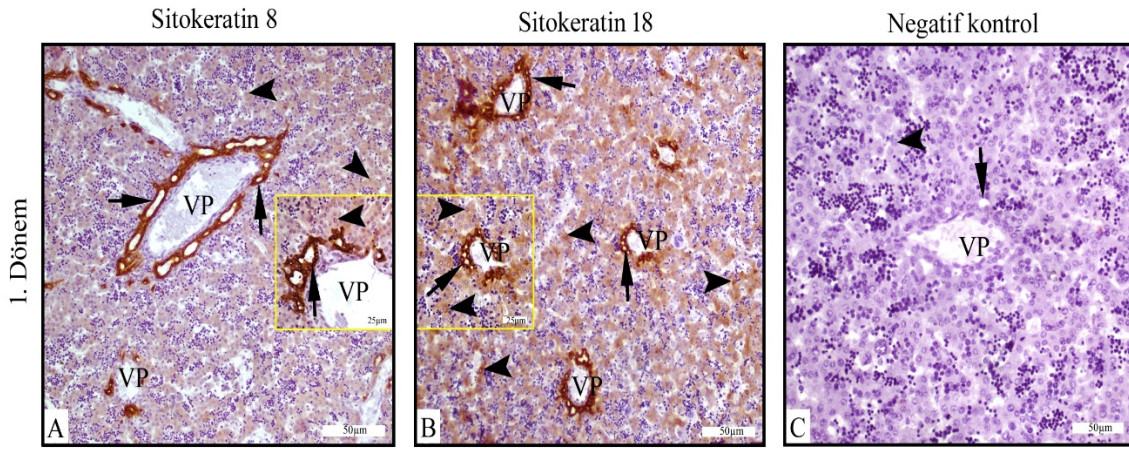
Antikorumlar	Karaciğer Hücreleri	1.Dönem	2. Dönem	3. Dönem
CK8	Hepatositler	+ / ++	-	+
	Vena Portalar	-	-	-
	Hepatik Arterler	-	-	-
	Safra kanal epiteli	+++	+++	+++
CK18	Hepatositler	++ / +++	++ / +++	-
	Vena Portalar	-	-	-
	Hepatik Arterler	-	-	-
	Safra kanal epiteli	+++	+++	+++

## Bulgular

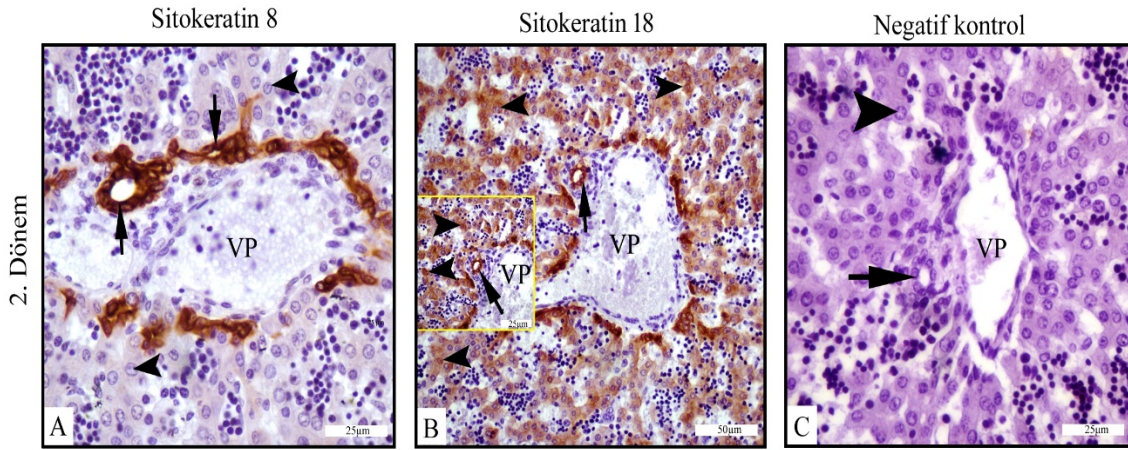
Immunohistokimya boyama sonucunda elde edilen bulgularda, CK8'in hepatositlerde gebeliğin birinci döneminde zayıftan ortaya yakın yoğunlukta olduğu (Şekil 1A), gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemlerinde ise immunreaksiyonun negatif olduğu belirlendi (Şekil 2A, 3A). Bununla birlikte gebelik süresince vena porta ve hepatik arterlerde de immunreaksiyonun meydana gelmediği gözlemlendi. Ancak safra kanalı epitel hücrelerinde gebeliğin her üç döneminde güçlü düzeyde bir immunreaksiyon şekillendiği tespit edildi (Şekil 1A, 2A, 3A).

CK18 proteini için yapılan immunohistokimya sonucunda da bu proteinin hepatositlerde gebeliğin birinci ve ikinci dönemlerinde orta ve ortadan güçlü yoğunluğa doğru bir immunreaksiyon şekillendiği ancak üçüncü dönemde ise negatif olduğu görüldü (Şekil 1B, 2B, 3B). Ayrıca CK8 de olduğu gibi gebelik süresince vena portalarda ve hepatik arterlerde immunreaksiyonun negatif olduğu saptandı. Ancak gebelik süresince safra kanalı epitel hücrelerinde güçlü düzeyde bir immunreaksiyon meydana geldiği tespit edildi (Şekil 1B, 2B, 3B).

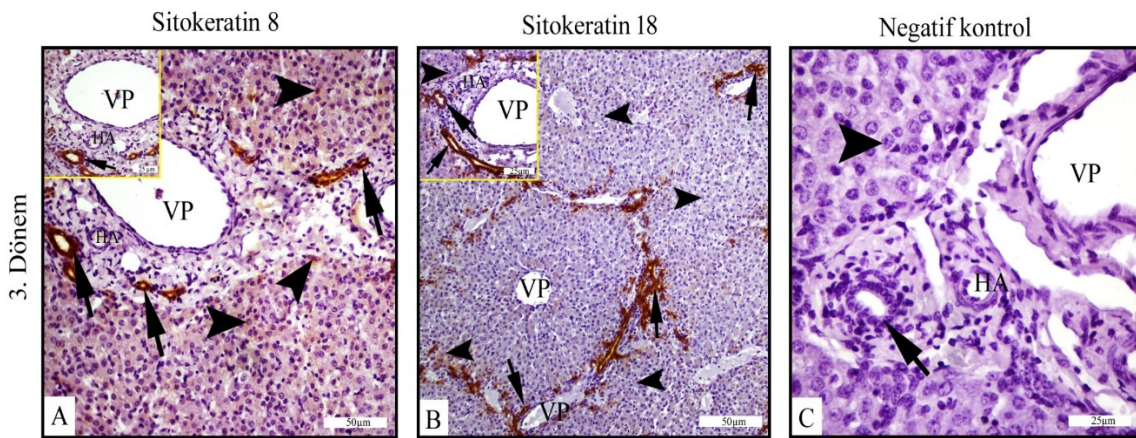
Boyamanın özgünlüğünü ortaya koymak amacı ile negatif kontroller kullanıldı (Şekil 1C, 2C, 3C).



**Şekil 1:** Gebeliğin birinci dönemindeki fetal sığır karaciğerinde sitokeratin 8 (CK8) ve sitokeratin 18 (CK18) proteinlerinin immunohistokimyasal dağılımı. VP: Vena Porta, Ok: Safra kanal epitel hücreleri, Ok başı: Hepatositler.



**Şekil 2:** Gebeliğin ikinci dönemindeki fetal sığır karaciğerinde sitokeratin 8 (CK8) ve sitokeratin 18 (CK18) proteinlerinin immunohistokimyasal dağılımı. VP: Vena Porta, Ok: Safra kanal epitel hücreleri, Ok başı: Hepatositler.



**Şekil 3:** Gebeliğin üçüncü dönemindeki fetal sığır karaciğerinde sitokeratin 8 (CK8) ve sitokeratin 18 (CK18) proteinlerinin immunohistokimyasal dağılımı. VP: Vena Porta, HA: Hepatik Arter, Ok: Safra kanal epitel hücreleri, Ok başı: Hepatositler.

## Tartışma ve Sonuç

Karaciğer gelişim sürecinin, epigenetik modülasyon ile belirlenen karmaşık bir gen ekspresyonunun dinamik olarak değişimine bağlı olduğu bilinmektedir. Buna paralel olarak karaciğer gelişimi için sitokeratinler, fetal proteinler ve adezyon molekülleri başta olmak üzere tüm gen ekspresyon ürünleri koordine edilmelidir (Feng ve ark., 2021). Sitokeratinler; hücre bölünmesi, hareketlilik, hücresel mekanik bütünlüğünün korunması ve vezikül taşınması gibi önemli hücresel işlevleri yerine getiren hücre iskelet proteinlerinin ara filamentleri ağında yer alırlar (Gonsebatt ve ark., 2007). Tipik olarak epitel hücrelerinde ekspresse olduğu bilinen sitokeratinlerden CK8 ve CK18'in; karaciğer, ekzokrin pankreas ve bağırsak gibi basit epitelde değişken ekspresyon oranlarında görüldüğü bildirilmiştir (Gonsebatt ve ark., 2007; Schöniger-Hekele ve ark., 2006).

CK8 ve CK18 proteinlerinin normal karaciğerdeki hepatositler ve safra kanal hücreleri için belirteç proteinler olarak görüldüğü ifade edilmiştir (Korver ve ark., 2021). CK8, 18 ve 19'un embriyonal hepatositlerde ekspresse olduğu, ancak erişkin karaciğerin ise sadece CK8 ve CK18 proteinlerini içerdiği bildirilmiştir (Basturk ve Adsay, 2011). Yine başka bir çalışmada insan karaciğer gelişiminin 3.ve 4. haftalarında hepatosit öncü hücreleri olan hepatoblastlar ile birlikte daha sonra hepatositlerde ve safra kanal epitel hücrelerinde CK8 ve CK18'in ekspresse olduğu gösterilmiştir (Feng ve ark., 2021; Terada, 2017). Diğer çalışmalarda da aynı şekilde embriyonal insan karaciğerinde CK8 ve CK18 proteinlerinin hepatositlerde ve safra kanalı hücrelerinde lokalize oldukları belirtilmiştir (Bateman ve Hübscher, 2010; Stosiek ve ark., 1990). Yetişkin insan karaciğerinde ise sitoplazmik intermedier filament çifti olarak CK8 ve CK18'in hepatositlerde ve safra kanalı hücrelerinde ekspresse olduğu ve bu proteinlerin eksikliğine bağlı olarak başta karaciğer olmak üzere birçok hastalığın gelişimine neden olduğu ifade edilmiştir (Eyken ve ark., 1988; Strnad ve ark., 2008). Genel olarak normal doku ve organlarda gözlenen keratinlerin canlılarda meydana gelebilecek hastalıklarda ekspresyon düzeylerinde dinamik farklılıklar gözlenir. Örneğin çeşitli insan karaciğer rahatsızlıklarında aşırı ekspresyon yoğunluğunun olduğu ve keratin 8 ile 18'in karaciğerde bulunma yoğunluğunun bozulduğu gözlenmiştir (Guldiken ve ark., 2014; Kucukoglu ve ark., 2014). Böylece bu bilgilere dayanarak karaciğer hasarının keratin 8 ve 18 boyaması ile tespit edilebileceği de belirtilmiştir (Toivola ve ark., 2015).

Sıçanlarda CK8 / 18'in karaciğerdeki aşırı ekspresyon artışı ile bozulan regülasyonun sıçan

hepatokarsinogenezise ve hepatoselüler karsinom oluşumuna pozitif etki ettiği ifade edilmiştir. Buna bağlı olarak da bu proteinlerin karaciğer kanserinde erken teşhis aracı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Kakehashi ve ark., 2010). Keratin 8, 18 ve 19 proteinlerinin inaktif edildiği farelerde karaciğer gelişiminin devam ettiği ve böylece düzenli karaciğer gelişiminin bu proteinlere bağlı olmadığı bildirilmiştir (Ku ve ark., 2007). Ancak bunun yanında bu proteinlerin eksikliğine bağlı olarak bu farelerde hafif kronik hepatit, hepatosit hücre yapısının bozulması ve çeşitli stres koşullarına karşı hassasiyet artışı olduğu bildirilmiştir (Ku ve ark., 2007; Omary ve ark., 2002; Zatloukal ve ark., 2004). Embriyonal dönemdeki farelerde yapılan çalışmada gebeliğin ilk haftasında CK8 ve CK 18'in hepatositlerde zayıf bir immunreaksiyon şekillendirdiği ve gebeliğin ilerlemesine bağlı olarak bu immunreaksiyonun normal ve hasarlı hepatositlerin çekirdek ve sitoplazmasında daha yoğun olduğu bildirilmiştir (Jeong ve ark., 2005). K8/K18'in nakavt veya mutasyon kaynaklı kusurları karaciğer hasarını şiddetlendirir ve transgenik farelerdeki karaciğeri belirli hastalıklara yatkın hale getirir. Kronik karaciğer hasarı hepatosellüler karsinom (HCC) insidansını yükselttiğinden, CK8/CK18 defektleri HCC insidansını artırabilecek faktörlerden biri olabilir. Ayrıca, bol miktarda sitoplazmik CK8/CK18, sinyal faktörleriyle etkileşime girerek ve bunların mevcudiyetini ve konumunu değiştirerek sinyal yollarını düzenlediği de bildirilmiştir (Strnad ve ark., 2008). Tavşan karaciğerinde CK18'in hepatositlerde ekspresse olduğu ancak portal damarlarda gözlenmediği gösterilmiştir (Wells ve ark., 1997). Köpeklerin normal karaciğer hepatositlerinde ve safra kanal hücrelerinde sitokeratin ekspresyonunun negatif, tümoral karaciğerde ise pozitif olduğu belirtilmiştir (Shiga ve Shirota, 2000). Bir başka çalışmada CK18'in sağlıklı köpek karaciğerinde gözlenmediği ve kronik hepatitis ile ekspresyon yoğunluğunun arttığı saptanmıştır (Lawrence ve ark., 2018).

İnsan (Basturk ve Adsay, 2011; Bateman ve Hübscher, 2010; Feng ve ark., 2021; Stosiek ve ark., 1990; Terada, 2017), fare (Jeong ve ark., 2005; Ku ve ark., 2007; Omary ve ark., 2002; Zatloukal ve ark., 2004), tavşan (Wells ve ark., 1997) ve köpeklerde (Lawrence ve ark., 2018) yapılan çalışmalarda çoğunlukla paralel olacak şekilde bizim çalışmamızda da CK8 ve CK18'in siğir fetal karaciğerinde ekspresse oldukları gözlenmiştir. Gebelik süresince her iki proteinin; safra kanal epitel hücrelerinde güçlü seviyede ekspresse olması bu hücrelerin gelişimi, çoğalması ve farklılaşmasında önemli rollere sahip olabileceklerini düşündürmüştür. Ayrıca insan, fare, tavşan ve bazı köpeklerde olduğu gibi sunulan çalışmada da CK8 ve CK18'in hepatositlerde lokalize olduğu görülmüştür. Fakat gebeliğin ikinci

döneminde CK8'in, gebeliğin üçüncü döneminde ise CK18 proteininin negatif olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu dönemlerdeki hücrelerin farklılaşma durumuna ve buradaki hücrelerin fizyolojik aktivitelerine göre değişiklik gösterebildiğini akla getirmiştir. Ayrıca insan ve farelerin aksine CK18'in gebeliğin son döneminde negatif olması türler arasındaki farklılıktan da kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak CK8 ve CK18 proteinlerinin sıgır karaciğerindeki hepatositler ve safra kanal epitel hücreleri içinde ayırıcı belirteçler olarak kabul edilebilecekleri düşünülmüştür. Ayrıca bu proteinlerin immunohistokimyasal lokalizasyonlarına göre; sıgır karaciğer gelişiminin kontrolü, hepatositlerin ve safra kanal epitel hücrelerinin bölünmesi, çoğalması ve farklılaşmalarının yanı sıra birçok metabolik ve fizyolojik süreçlerde kritik rollere sahip olabilecekleri akla getirilmiştir. Bunlar doğrultusunda da CK8 ve CK18'in sıgırlarda fetal yaşamın sürdürülmesine katkı sağlayarak tür devamlılığına pozitif anlamda etki edebilecekleri kanaatine varılmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışmadaki bulguların değerlendirilmesinde desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK'a teşekkürlerimi sunarım.

### Çıkar Çatışması

Yazar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

### Etik İzin

Hayvan Deneyleri Etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğin (15.02.2014) 8. maddesinin k bendi 1. fıkrasında belirtildiği üzere çalışmamızda kullandığımız materyal; mezbaha materyali olduğundan HADYEK iznine tabi değildir.

### Benzerlik Oranı

Sunulan çalışmanın benzerlik oranının sisteme yüklenen raporda belirtildiği gibi %11 olduğunu beyan ederim.

### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: UT

Tasarım: UT

Denetleme/Danışmanlık: UT

Veri Toplama ve/veya İşleme: UT

Analiz ve/veya Yorum: UT

Kaynak Taraması: UT

Makalenin Yazımı: UT

Eleştirel İnceleme: UT

### Kaynaklar

- Akiyoshi H, Inoue AM, 2012: Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. *Comp Hepatol*, 11 (1), 2.
- Basturk O, Adsay VN, 2011: Immunohistology of the pancreas, biliary tract, and liver In: Diagnostic Immunohistochemistry (Third Edition), 541-592.
- Bateman AC, Hübscher SG, 2010: Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology*, 56, 415-425.
- Devkota B, Sasaki M, Takahashi KI, Matsuzaki S, Matsui M, Haneda S, Takahashi M, Osawa T, Miyake YI, 2006: Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testis. *J Reprod Dev*, 52 (1), 43-49.
- Eyken PV, Sciot R, Paterson A, Callea F, Kew MC, Desmet VJ, 1988: Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study 1. *Hum Pathol*, 19 (5), 562-568.
- Feng J, Zhu R, Yin Y, Wang S, Zhou L, Lv F, Dawei Zhao D, 2021: Re-recognizing the cellular origin of the primary epithelial tumors of the liver. *J Hepatocell Carcinoma*, 7 (8), 1537-1563.
- Gonsebatt ME, Del Razo LM, Cerbon MA, Zuniga O, Sanchez-Pena LC, Ramirez P, 2007: Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression. *Arch Toxicol*, 81, 619-626.
- Guldiken N, Usachov V, Levada K, Trautwein C, Zioli M, Nahon P, Strnad P, 2014: Keratins 8 and 18 are type II acute-phase responsive genes overexpressed in human liver disease. *Liver Int*, 35 (4), 1203-12.
- Ham AW, Cormack DH, 1979: Histology: The pancreas, liver and gallbladder. 8th dn. JB, 694-724, Lippincott Company, Philadelphia and Toronto.
- Harris RM, Synder BG, Meyer RM, 1983: The relationship of bovine crown rump measurement to fetal age. *Agri Practice*, 1, 16-22.
- Jeong W, Jeong DH, Do SH, Yang HJ, Hong IH, Chang SJ, Yuan DW, Kwak DM, Kim TH, YK, Lee IS, Shik Jeong KS, 2005: Expression of cytokeratins 8 and 18 on mallory body and oval cell in rats during hepatic fibrosis. *In vivo*, 19, 769-776.
- Kakehashi A, Kato A, Inoue M, Ishii N, Okazaki E, Wei M, Tachibana T, Wanibuchi H, 2010: Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 242 (1), 47-55.
- Korver S, Bowen J, Pearson K, Gonzalez RJ, French N, Park K, Jenkins R, Goldring C, 2021: The application of cytokeratin-18 as a biomarker for drug-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, 95, 3435-3448.
- Ku NO, Strnad P, Zhang BH, Tao GZ, Omary BM, 2007: Keratins let liver live: mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology*, 46 (5), 1639-1649.

- Kucukoglu O, Guldiken N, Chen Y, Usachov V, El-Heliebi A, Haybaeck J, Denk H, Trautwein C, Strnad P, 2014: High-fat diet triggers Mallory–Denk body formation through misfolding and crosslinking of excess keratin 8. *Hepatology*, 60(1):169-78.
- Kumar A, Jagannathan N, 2018: Cytokeratin: A Review on Current Concepts. *Int J Orolac Biol*, 2 (1), 6-11.
- Lawrence YA, Dangott LJ, Rodrigues-Hoffmann A, Steiner JM, Suchodolski JS, Lidbury JA, 2018: Proteomic analysis of liver tissue from dogs with chronic hepatitis. *PLoS One*, 13 (11), e0208394.
- Liao J, Lowthert LA, Ku NO, Fernandez R, Omary MB, 1995: Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: Polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J Cell Biol*, 131 (5), 1291-301.
- Lim Y, Ku NO, 2021: Revealing the roles of keratin 8/18-associated signaling proteins involved in the development of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6401.
- Michalopoulos GK, 2007: Liver regeneration. *J Cell Physiol.*, 213 (2), 286-300.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R, 1982: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31 (1), 11-24.
- Naik KS, Lokanadham S, Gurushanthaiah M, 2020: Different gestational age related histogenesis of human foetal liver. *Int J Anat Res*, 8 (1.3), 7408-11.
- Omary MB, Ku NO, Toivola DM, 2002: Keratins: guardians of the liver. *Hepatology*, 35: (2), 251-257.
- Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA, 2013: The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr Opin Cell Biol.*, 25 (1), 47-56.
- Schöniger-Hekele M, Petermann D, Müller C, 2006: Mutation of keratin 8 in patients with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 (9), 1466-1469.
- Shiga A, Shirota K, 2000: Vimentin / Cytokeratin coexpression foci in a well-differentiated canine hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.*, 62 (2), 199-202.
- Steinert PM, Marekov LN, Fraser RD, Parry DA 1993: Keratinintermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *J Mol Biol*, 230 (2), 436-52.
- Stosiek P, Kasper M, Karsten U, 1990: Expression of cytokeratin 19 during human liver organogenesis. *Liver*, 10 (1), 59-63.
- Strnad P, Stumptner C, Zatloukal K, Denk H, 2008: Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. *Histochem Cell Biol*, 129, 735-749.
- Strnad P, Paschke S, Jang KH, Ku NO, 2012: Keratins: Markers and modulators of liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.*, 28 (3), 209-16.
- Subhaana CF, Talapala VR, Seethamsety S, 2020: Histogenesis of human fetal liver from 12 weeks to 36 weeks of gestation. *Int J Res Med Sci.*, 8 (3), 931-936.
- Terada T, 2017: Human ductal plate and its derivatives express antigens of cholangiocellular, hepatocellular, hepatic stellate/progenitor cell, stem cell, and neuroendocrine lineages, and proliferative antigens. *Exp Biol Med (Maywood)*, 242 (9), 907-917.
- Toivola DM, Boor P, Alam C, Strnad P, 2015: Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.*, 32, 73-81.
- Trefts E, Gannon M, Wasserman DH, 2017: The liver. *Curr Biol*, 27 (21): 1147-51.
- Wells MJ, Hatton MW, Hewlett B, Podor TJ, Sheffield WP, Blajchman MA, 1997: Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J Biol Chem*, 272 (45), 28574-81.
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Fickert P, Lackner C, Trauner M, Denk H, 2004: The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol*, 204(4), 367-376.

\*Yazışma Adresi: Uğur TOPALOĞLU

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

e-mail: ugur.topaloglu@dicle.edu.tr