

Koyunlarda Paraziter Kaynaklı Karaciğer Fibrozisinde İmmunohistokimyasal İncelemeler

Ayhan AKGÜN^{1*}

Fatma İLHAN²

ÖZET: Karaciğer fibrozisi, ülkemizde ve dünyanın pekçok bölgesinde insan ve hayvan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu çalışmada, makroskopik incelemede paraziter fibrozis bulguları gösteren 30 koyun karaciğeri histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak (α -SMA, iNOS COX-2, p53 ve PCNA) incelendi. Histopatolojik incelemede portal alanlarda lenfosit, makrofaj ve eozinofilden oluşan hücre infiltrasyonu ile fibrozis, parankimde vena sentralisleri bulunmayan rejenere hepatositlerin oluşturduğu nodüller (pseudolobulus) şekillenmişti. Ayrıca bazı olgularda içinde yabancı cisim dev hücreleri bulunan granülomlar görüldü. İmmunohistokimyasal incelemede; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fibrotik karaciğerlerde α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA için çok daha yüksek pozitiflik gözlemlendi. Fibroziste bağ doku artışını göstermek için α -SMA, karaciğer tümörlerinin temelinde fibrozis ve sirozun olması ve yara iyileşmesinde rol alması yönünden COX-2, artan proliferasyonun değerlendirilmesinde PCNA, apoptozis için p53; paraziter enfeksiyonlarda makrofajlarda salınması yönünden iNOS antikorunun kullanılmasının faydalı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer paraziter fibrozis, α -SMA, iNOS, COX-2, p53, PCNA.

Immunohistochemical Investigation in Sheep with Parasitary Liver Fibrosis

ABSTRACT: Liver fibrosis significantly effect human and animal health in our country and worldwide. In this study, 30 sheep liver tissues with macroscopical parasitary fibrosis and 10 healthy liver tissues were taken in terms of histopathologically and immunohistochemically (α -SMA, iNOS COX-2, p53 and PCNA). Cell infiltration consisting of lymphocytes, macrophages and eosinophils and fibrosis were detected in portal area in histopathological investigation. And also there was nodules (pseudolobulus) formed by regenerated hepatocytes that do not vena centralis in center. Also granulomas contained in foreign body giant cells were seen. According to immunohistochemical examination; stronger positivity was observed in α -SMA, iNOS, COX-2, p53 and PCNA compared to control group. It has been found beneficial to use α -SMA to demonstrate connective tissue uptake in fibrosis, using COX-2 as due to fibrosis and cirrhosis at the base of liver tumors and their role in wound healing; using PCNA in order to evaluate increase proliferation, using p53 for apoptosis, using iNOS antibody as its secreted from macrophages in parasitic infections.

Keywords: Liver parasitary fibrosis, α -SMA, iNOS, COX-2, p53, PCNA

¹ Ayhan AKGÜN (Orcid ID: 0000-0001-6585-8655), Iğdır Üniversitesi, Tuzluca Meslek Yüksekokulu, Iğdır, Türkiye

² Fatma İLHAN (Orcid ID: 0000-0003-0363-6285), Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ayhan AKGÜN, e-mail: ayhanakgun7676@gmail.com

Bu çalışma Ayhan AKGÜN'ün Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiştir. Makale 9-11 Ekim, 2017 tarihinde Iğdır'da düzenlenen II. Uluslararası Iğdır Sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Karaciğerde fibrozis, karaciğerin kronik hasara karşı gösterdiği bir reaksiyon olup yangısal hücre infiltrasyonu ve yoğun kollajen içeren ekstrasellülmatriks birikimi ile karakterize kompleks bir olaydır (Golbarve ark., 2013).

Karaciğer fibrozisi çeşitli endojen ve eksojen sebeplerle oluşmaktadır. İnsanlarda çoğunlukla viral hepatitler, koyun ve sığırlarda ise genellikle paraziter nedenlerden kaynaklanmaktadır (*Balkaya ve ark., 2010*). Karaciğer fibrozisinin en ileri aşaması sirozdur (Wynn ve Barron, 2010; Golbar ve ark., 2013). Siroz, dünyada ve ülkemizde insanlarda en sık görülen 10 ölüm sebebinden birisidir (Kumar ve ark., 2014). Sirozun en önemli iki nedeni kronik alkolizim ve viral hepatitlerdir. Ancak, çoğunlukla koyun ve sığırların karaciğer trematodu olarak bilinen *Fasciola* sp. insanlarda da enfeksiyon oluşturmakta ve akut hepatit tablosundan kronik hepatit, fibrozis ve siroza kadar değişen hastalık tablosuna sebep olmaktadır (Benzer, 2003; Cordova ve ark., 1998). Özellikle hayvanlarda görülen Fasioliiazis; *Fasciola hepatica* ve *Fasciola gigantica* tarafından oluşturulan gıda kaynaklı zoonoz bir hastalıktır. İnsanlarda 1990'lı yıllardan sonra fasioliiazisli vakalar artmaya başlamıştır (Şahin ve Yazar, 2008; WHO, 2014). Dünya Sağlık Örgütüne göre en az 2.4 milyon insan enfekte ve milyonlarca insanda risk altındadır (WHO, 2014).

α -SMA, myofibroblast farklılaşmasını ortaya koyan önemli bir belirteç olarak bilinir. α -SMA, sağlıklı yetişkin karaciğerinde çok az sayıda hücrede pozitifken, fibroziste aktive olan karaciğer stellat hücrelerinin myofibroblast benzeri hücrelere dönüşmesiyle çok yoğun immunreaktivite gösterirler (Erdoğan, 2010).

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) antimikrobiyal, yangı önleyici, sitotoksik ve sitostatik fonksiyonlara sahip serbest radikaldir.

Organizmada bakteriyel, viral, protozoon, helmint veya fungal bir enfeksiyon şekillendiğinde spesifik sitokinlerin etkisiyle aşırı miktarlarda üretilir (Brunet, 2001).

Karaciğer fibrozisinin en ileri aşaması sirozdur ve sirozun da pek çok komplikasyonunun nedeni karaciğerde gelişen fibrozistir (Golbar ve ark., 2013). Kronik hepatitlerde en önemli enzimlerden birisi Siklooksijenaz (COX) enzimi olup yangının başlaması ve devamında anahtar rol oynar. Bu nedenle de karaciğerde gelişen fibrozisten sorumlu olduğu düşünülmektedir. COX enziminin iki alt tipi COX-1 ve COX-2 enzimleridir. COX-1 fizyolojik olayları düzenler. COX-2 ise patolojik süreçlerde rol alır. Proliferasyonu hızlandırarak, anjiogenezisi artırarak ve apoptozisi inhibe etmek suretiyle hepatosellülerkarsinom (HCC) oluşumuna katkıda bulunur. Yapılan az sayıdaki çalışmada COX-2'nin artan karaciğer fibrozisiyle birlikte dokuda arttığı gösterilmiştir (Rocha ve ark., 2014).

Tümör baskılayıcı protein olarak bilinen p53, hücre döngüsü, DNA tamiri ve apoptozisin düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli genlerin transkripsiyon hızını düzenleyen bir faktördür. DNA hasarı, hipoksi, viral enfeksiyonlar ve tümörler gibi çeşitli stres durumlarında artmaktadır (Taylor ve Cote, 1994). Hepatitis B virüsü ve aflatoksine maruz kalarak oluşan HCC'lerde, p53 protein birikiminin yoğun olarak şekillendiği bildirilmektedir (Qi ve ark., 2014). PCNA ise bir nükleer proteindir. Hücre proliferasyonunun başlamasında rol oynamaktadır (Taylor ve Cote, 1994).

Tüm dünyada sirozun insanlarda en önemli ölüm sebeplerinden biri olmasından dolayı, insanlarda karaciğer fibrozisine ve sirozuna sebep olan hastalık modellerine benzeyen deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesi ile

İlgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Karaciğer parazitlerinin hem hayvanlarda hem de son yıllarda insanlarda sıklıkta görülmesi kronik hepatit ve ilerleyen durumlarda fibrozis ve siroza sebep olmasından dolayı, bu çalışmada karaciğerde siroz ve fibrozis mekanizmalarının değerlendirilmesinde sağlam ve doğal parazitler fibrozisli koyun karaciğerlerinde α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA proteinlerinin immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Van Büyükşehir Belediye Mezbahasında kesilen ve kesim sonrasında makroskopik incelemede kronik parazitler hepatit bulguları gösteren 30 karaciğer dokusu ile sağlıklı görünen 10 karaciğerden histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler amacıyla doku örnekleri alındı. Karaciğer örnekleri %10'luk tamponlu formalinde tespit edildikten sonra, parafinde bloklandı. Histopatolojik inceleme için hematoksilin-eozin (HE) ve Masson Trikrom, immunohistokimyasal inceleme için Avidin-Biotin-Peroksidaz (ABC) kompleks immunperoksidaz yöntemi (COX-2, PCNA, p53, iNOS, α -SMA) boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. İmmunperoksidaz inceleme amacıyla adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5 dk. yıkandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH7.2) ile 5 dk. yıkandı, %0.3'lük H₂O₂ de 30 dk. tutularak endojen peroksidaz aktive edildi. PBS de 5-10 dk. yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan protein blok ile 5 dk. inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkama yapılmadan primer antikorlar (COX-2, PCNA, p53, iNOS, α -SMA) damlatıldı. Primer antikora

uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece +4°C'de bekletildi. PBS ile 2 kez 5'er dk. yıkandı, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkube edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidazda 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere AEC (3-amino-9-etil karbazol) kromojen damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilinde 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Su bazlı yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı (Taylor ve Cote, 1994).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Makroskopik incelemede (Şekil 1) karaciğerlerin yoğun fibrozisten dolayı oldukça sert kıvamda ve soluk renkte olduğu görüldü. Safra kesesi ve safra kanallarının dilate olup duvarlarının kalınlaştığı, bu nedenle safra kanallarının dışardan daha belirgin olarak dikkat çektiği gözlemlendi. Dış yüzeyinde grimsi beyaz sert fibrotik odakların bulunduğu karaciğerlerin kesit yüzeyinde safra kanalları ve safra kesesinin içinde kahverengimsi müköz eksudat ve erişkin parazitler görüldü. Fibrozisli karaciğerlerin kesit yüzünde çok sayıda küçük kum kelebeği şeklinde olan *D. dentriticum* ile kelebek şeklinde *F. hepatica*'lar ve karaciğer paranzimine fibröz bir bantla bağlanan *C. tenuicollis* görüldü.

Alınan karaciğer kesitlerinin HE ve immunohistokimyasal boyanmaları (α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA) birbirleriyle ve kontrolleriyle karşılaştırmalı olarak incelendi. Histopatolojik bulgular ve immunohistokimyasal bulgular Tablo 1'de gösterildi. İncelenen 30 vakanın tamamında safra kanalı proliferasyonu, eozinofil lökosit infiltrasyonu, lenfosit, plazmasit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu, bilier fibrozis ve nekroz-dejenerasyon gözlenirken, 6'sında granülom gözlemlendi.

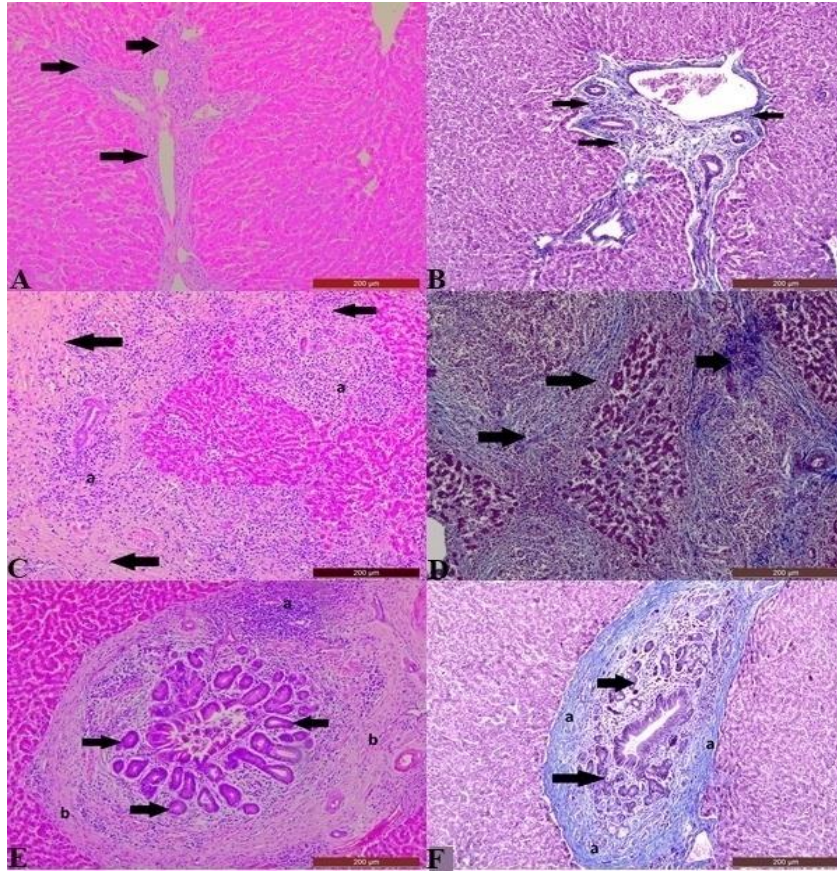


Şekil 1. Makroskobik görünüm.

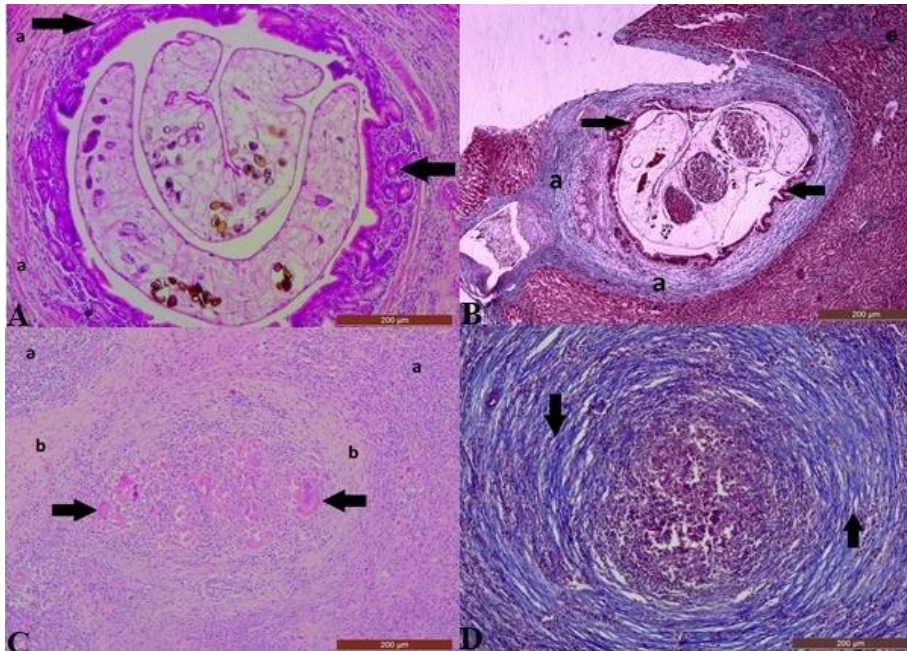
Hepatositler şişkin, sitoplazmaları granüler ve eozinofilikti. Portal alanda lenfosit, makrofaj ve eozinofilden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ve fibrozis gözlemlendi (Şekil 2 A). Masson-Trikrom boyası ile fibrozis daha net olarak ortaya konuldu (Şekil 2 B). Bazı olgularda parankimdeki parazit göçleri sonucu oluşan travmatik nekrotik odakların onarımı sürecinde diffuz parankimal fibrozis şekillenmişti. Bu olgularda fibröz dokunun hepatositleri sararak, hepatositlerin oluşturduğu hücre kordonlarının düzenini bozduğu gözlemlendi. Merkezde vena sentralisleri bulunmayan rejener hepatositlerin oluşturduğu nodüller (pseudolobuluslar-rejeneratif lobül) şekillenmişti (Şekil 2 C, D). Fibrozisin yoğun görüldüğü parankimal alanlarda hepatositler arasına sızmış yer yer lenfosit, makrofaj ve eozinofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Safra kanalı epitellerinde hiperplazi ve çevresini saran değişen şiddette MNH infiltrasyonu ile fibrozis gözlemlendi (Şekil 2 E, F). Bu safra kanallarının bir kısmında safra kanallarının lumeninde parazitin erişkin formu ve yumurtaları görüldü (Şekil 3 A, B). Pembe

renkte geniş sitoplazmaya sahip, çok çekirdekli dev hücreleri ve MNH'ler bulunan fibröz doku ile sarılmış granülomlar görüldü (Şekil 3 C, D).

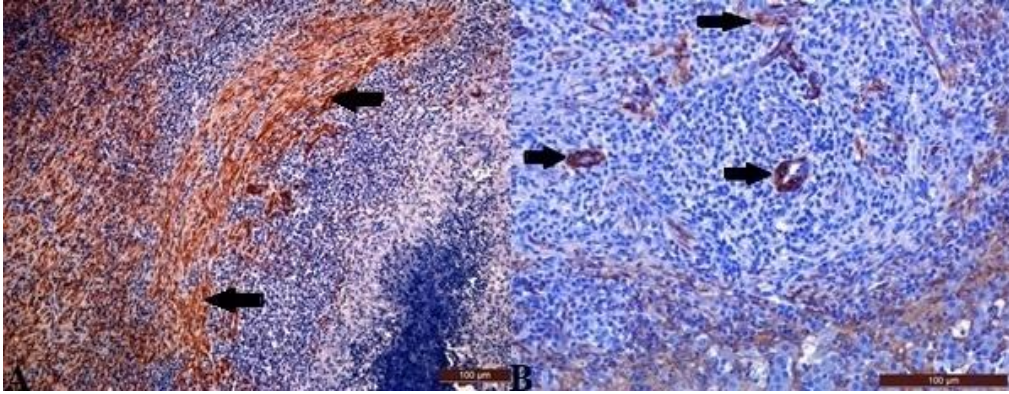
Fibrozisli karaciğer dokularında immunohistokimyasal olarak α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA araştırıldı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fibrotik karaciğerlerde α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA da yüksek pozitiflik gözlemlendi. Fibrotik karaciğerlerde α -SMA'nın proliferatif myofibroblastların yoğun olduğu yerlerde belirgin bir şekilde immunpozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 4 A). Myofibroblastlar, damar düz kas hücreleri ve MNH infiltrasyonlarında COX-2 immunpozitifliği (Şekil 4 B). iNOS ise makrofaj, dev hücreler ve damar endotel hücrelerinde pozitifliği (Şekil 5 A, B). p53 hepatosit sitoplazması ile granülomlardaki dev hücrelerinde pozitifliği (Şekil 5 C). Fibroblast, lenfosit, hepatositlerin çekirdekleri ve safra kanalı epitelyum hücrelerinde PCNA immunpozitifliği (Şekil 5 D). Kontrol dokularında α -SMA, COX-2, p53 ve PCNA proteinleri çok az sayıda hücrede çok daha hafif şiddette boyanmasına rağmen iNOS immunnegatifliği.



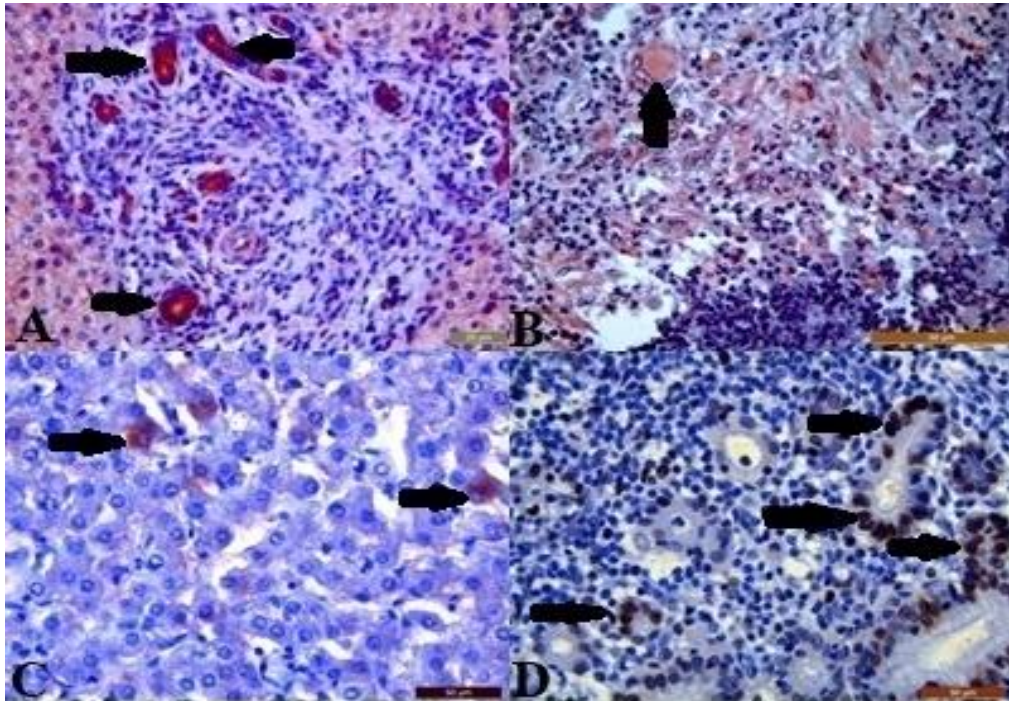
Şekil 2. Mikroskopik görünüm (HE: A, C, E; Masson Trikrom: B, D, F): (A,B,C,D: (oklar) fibrozis; C,E (a) MNH infiltrasyonu; E, F (oklar) safra kanal proliferasyonu, (b) fibrozis; F (a) bağ doku proliferasyonu.



Şekil 3. Mikroskopik görünüm (HE: A, C; Masson Trikrom: B, D): A,B: (oklar) Safra kanalı bez epitellerinde proliferasyon: (a) safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu; C: (oklar) dev hücreler, (b) granülomu çevreleyen bağ doku proliferasyonu, (a) MNH infiltrasyonu; D: (oklar) bağ doku proliferasyonu



Şekil 4. Mikroskopik görünüm (İmmunperoksidaz boyama): α -SMA: A (oklar) myofibroblast; COX-2: B (oklar) damar düz kas hücreleri immunpozitif.



Şekil 5. Mikroskopik görünüm (İmmunperoksidaz boyama): (iNOS): A (oklar) damar endotel hücreleri immunpozitif; B (oklar) dev hücreler immunpozitif; (p53): (oklar) apoptotik hepatositler; (PCNA): (oklar) proliferen safra kanal epitel hücre çekirdekleri.

Fasciola hepatica, *Fasciola gigantica*, *Dicrocoelium dentriticum*, *Cysticercus tenuicollis* sığır ve koyunların karaciğerinde diffuz ya da fokal fibroze sebep olan paraziter etkenlerdir (Şimşek ve ark., 2004). Zoonoz olan fasioliazisin insan sağlığını önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (WHO, 2014). Karaciğer fibrozisi ve siroz ile ilgili çok sayıda deneysel çalışma yapılmış olmasına rağmen, evcil hayvanlarda doğal enfeksiyonlarla ilgili sınırlı

sayıda ayrıntılı patolojik ve immunohistokimyasal çalışma bulunmaktadır (Golbar ve ark., 2013). α -SMA, kronik karaciğer fibrozisinde sitokinler aracılığı ile fibroz kollojen içeren ekstra sellüler matriks sentezleyen hücrelerde immunpozitifdir. Bu yoğun hücreleri ortaya koyan α -SMA ekspresyonu ile kesin bir şekilde belirlenir. α -SMA ayrıca damar düz kas hücrelerinde de bulunur (Erdoğan, 2010; Golbar ve ark., 2013).

Tablo 1. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular

	HİSTOPATOLOJİK BULGULAR						İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR				
	FİBROZİS		Safra kanalı proliferasyonu	Nekroz-Dejenerasyon	MNH infiltrasyonu	Eozinofil lökosit infiltrasyonu	α-SMA	iNOS	COX-2	PCNA	p53
	Bilier Fibrozis	Diffüz Fibrozis									
1* ^a	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
2 ^a	++	++	+++	+	++	++	++	++	++	++	+
3	+++	+	+++	+	+	+	+++	+	+++	++	+
4	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
5*	+	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	++
8	++	-	+	+	+	++	++	+	++	++	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10*	+	+	+	-	+	+++	+	+	+	+	+
11*	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
12	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
13	++	+	++	+	+	+	++	+	+	++	+
14* ^a	++	+++	+	+	+	+	+++	++	+	+	+
15	++	+	++	+	+	+++	++	+	++	++	+
16	++	+	++	++	+	+	++	+	+	+	+
17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	-	+	++	+	++	+	+	+	+	+
20	++	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+
21	+	-	+	++	+	+	+	+	+	+	++
22 ^a	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
23*	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+
24	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
25 ^a	+++	++	++	+	++	+	+++	++	++	++	++
26	+	-	+	+	+	++	+	+	+	+	+
27* ^a	++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	++	++	+
28	++	+	++	+++	+	+	++	+	+	++	+
29*	+	-	++	+	+	+	+	+	+	++	+
30*	++	-	+	+	+	+++	++	++	+	+	++

* İşaretli olgularda granülom bulunmaktadır. (a) işaretli olgular ise sirozlu vakalardır.

Baddamwar (2004)'ın, *Schistosoma japonicum* ile domuzlarda deneysel, Golbar ve ark. (2013) sığırlarda doğal fasioliiazis ile Marinkoviç ve ark. (2013) tarafından *Fasciola* spp. ile doğal enfekte alageyiklerin karaciğer fibrozisinde karaciğer stellat hücrelerinin, safra kanallarının epitel hücrelerinin ve granümları saran fibroblast benzeri hücrelerin α-SMA pozitif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca portal alanda kan damarlarında arttığı ve bu damar düz kas hücrelerinde pozitif olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fibrozisli karaciğerlerde α-SMA'nın çok daha yoğun immunpozitif boyandığı görüldü. α-SMA ile fibroziste aktive olarak myofibroblastlara

dönüşen karaciğer stellat hücreleri yoğun şekilde boyandı. iNOS, yara iyileşmesinde ve fibroziste rol oynamaktadır. Paraziter etkenlerin vücuda girmesi ile tümör nekroz faktör, IL-1, IL-2 gibi sitokinler ve lipopolisakkaritler özellikle makrofajlardan iNOS sentezini sağlamaktadır. Ayrıca nötrofil, damar endotel hücreleri ve mast hücrelerinden de iNOS sentezlenmektedir (Anavi ve ark., 2015). Rottenberg ve ark., (1996) *Trypanosoma cruzi* infeksiyonlarında immunohistokimyasal olarak parazit yüzeyinde ve çevresindeki hücrelerle iNOS immunreaktivitesini göstermişlerdir. Santos ve ark., (2011) viseral leishmaniozisli doğal enfekte köpeklerin dalağında iNOS immun reaktivitesi

immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Nonenfekte kontrol grubuna göre enfekte köpeklerde iNOS miktarının önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Anavi ve ark., (2015) yüksek kolestrolün sebep olduğu, karaciğer fibrozisi ile ilgili farelerde yaptığı deneysel çalışmada iNOS'un karaciğer fibrozisinde önemli bir mediatör olduğunu hepatosit ve yangı hücrelerinin iNOS pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada özellikle makrofajlar, granülomlardaki dev hücrelerin sitoplazmaları ve damar endotel hücreleri immunpozitif. iNOS hem paraziter enfeksiyonlarda artmakta hem de yara iyileşmesi ve karaciğer fibrozisinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada paraziter kaynaklı fibrozis değerlendirildiği için iNOS tüm olgularda pozitif bulundu. p53 proteini, hücre çekirdeğinde bulunan gen, hasara maruz kaldığında bu proteinin sentezlenmesi sağlanmaktadır (Özdemir, 1998). Tousson ve ark., (2012) *Schistosoma mansoni* ile deneysel olarak enfekte fare karaciğer dokularını histopatolojik ve immunohistokimyasal (p53, CD 68) olarak incelemişlerdir. Şiddetli fibrozise sebep olan *Schistosoma mansoni* ile enfekte olan fare karaciğerlerinde granülomların çevresi ve hepatosit sitoplazmalarının p53 pozitif olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da apoptotik hepatositler ile granülomların merkezinde bulunan yabancı cisim dev hücrelerinin sitoplazmalarında p53 pozitiflik gözlemlendi. Beytut ve ark. (2011) *F. hepatica* ile ratlarda oluşturdukları deneysel kronik fibroziste kronik göç yollarındaki lenfositler, bağ doku hücreleri ve proliferatif safra epitel hücrelerinin çekirdeklerinde PCNA immunpozitiflik bildirmişlerdir. Bu çalışmada da özellikle proliferatif safra kanalı epitel hücre çekirdekleri ve göç yollarında odaklar oluşturmuş lenfositlerde yoğun immunpozitiflik gözlemlendi. Ayrıca, granülomları çevreleyen MNH tabakasındaki lenfositlerinde yoğun immunreaktivite verdiği dikkati çekti. PCNA pozitifliğinin bu kadar yoğun

gözlenmesi muhtemelen doku tamiri aşamasındaki aktivasyonun kuvvetli olduğuna işaret etmektedir. Oysa PCNA yoğunluğunun süreklilik göstermesi tümöre dönüşme olasılığına da işaret etmektedir. Ancak bu çalışma doğal bir çalışma olduğundan ve patogenezin farklı günlerinde değerlendirme imkanı olmadığından böyle bir durum sadece muhtemel ihtimal dahilinde değerlendirilmiştir. Sirozun en ciddi komplikasyonlarından birisi de HCC gelişimidir. HCC'nin %90'ı sirotik zeminde gelişir. COX-2'nin ise kanser prekürsörü lezyonlarda ve kanser hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. HCC'nin büyük çoğunlukla siroz sonucunda şekillenmesi ve fibrozisin siroza dönüşme oranının yüksek olması, ileri evre fibrozisin bir kanser prekürsörü olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla fibrozise katkısı olan faktörlerin HCC'ye de katkısının olabileceği ve HCC gelişiminde rol oynayan COX-2'nin fibrozisin ilerlemesine katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Ito ve ark., 2003). Rocha ve ark., (2014) karbon tetraklorür (CCl₄) ile deneysel fibrozis oluşturdukları fare karaciğerlerinde COX-2, iNOS ve α -SMA pozitifliğinin kontrol karaciğerlerine göre çok yüksek olduğunu immunofloresan, immunperoksidaz ve PCR yöntemleriyle tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da paraziter kaynaklı karaciğer fibrozisinde, fibrotik karaciğerlerde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA'nın çok daha yüksek pozitiflik verdiği gözlemlendi. COX-2'nin özellikle fibrotik alanlarda immunpozitif olduğu tespit edildi. Bu çalışmada paraziter fibrozisli koyun karaciğerlerinde α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA ilk kez ayrıntılı olarak incelendi.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar karaciğer fibrozisi ile daha önce yapılmış çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulundu. α -SMA myofibroblast benzeri hücrelerde pozitiflik göstererek fibrozisin şiddetini ortaya

koymaktadır. Fibroziste artan bağ doku artışını göstermek için α -SMA, karaciğer tümörlerinin temelinde fibrozis ve sirozun olması ve yara iyileşmesinde rol alması yönünden COX-2, artan proliferasyonun değerlendirilmesinde PCNA, apoptozis için p53, paraziter enfeksiyonlarda makrofajlarda salınması yönünden iNOS antikorunun kullanılmasının faydalı olduğu görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2015-SBE-YL077 nolu proje ile desteklenmiş, Doç. Dr. Fatma İLHAN danışmanlığında yapılan aynı adlı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Anavi S, Eisenberg-Bord M, Hahn-Obercyger M, Genin O, Pines M, Tirosch O, 2015. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis, *Laboratory Investigation*, 95, 914-924.
- Baddamwar A, 2004. Hepatic fibrosis in experimental *Schistosom japonicum* infection in pigs, Master of Science Programme in Veterinary Medicine for International Students Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Balkaya İ, Kapakin Terim KA, Atasever İ, 2010. *Fasciola hepatica* ile doğal enfekte sığır karaciğerlerinin morfolojik ve histopatolojik olarak incelenmesi, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 5, 1, 7-11.
- Benzer F ve Temizer OS 2003. *Fasciola hepatica* ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 657-661.
- Beytut E, Akça A, Gökçe Hİ, 2011. Pathological and immunohistochemical evaluation of the effects of interferon gamma (IFN- γ) and aminoguanidine in rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 35, 4, 243-253.
- Brunet LR, 2001. Nitric oxide in parasitic infections, *International Immunopharmacology*, 1, 1457-1467.
- Cordova M, Reategui L ve Espinoza JR 1998. Immunodiagnosis of human Fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases, *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 3, 766-772.
- Erdoğan S, 2010. Safra yolu bağlanmış sıçanlarda antitrombotik ajan dalteparinin hepatik fibrozis gelişimini önlemedeki rolü. Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi (Basılmış).
- Golbar HM, Izawa T, Juniantito V, Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J, 2013. Immunohistochemical characterization of macrophages and myofibroblasts in fibrotic liver lesions due to *Fasciola* infection in cattle, *Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 7, 857-65.
- Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K and Miyauchi A, 2003. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms, *Histopathology*, 42, 492-497.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Astes JS, 2014. Robbins and cotran pathological basis of disease, Philadelphia US: Elsevier Saunders, 877-927.
- Marinković D, Kukulj V, Aleksić-Kovačević S, Jovanović M, Knežević M, 2013. The role of hepatic myofibroblasts in liver cirrhosis in fallow deer (*Dama dama*) naturally infected with giant liver fluke (*Fascioloides magna*), *BMC Veterinary Research*, 6, 9, 45.

- Özdemir E, 1998. Ürotelyal karsinogenezis araştırılmasında p53 anahtarı, *Türk Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 18, 277-284.
- Qi LN, Bai T, Chen ZS, Wu FX, Chen YY, De Xiang B, Peng T, Han ZG, Li LQ, 2014. The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China: role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure, *Liver International*, 35, 3, 999-1009.
- Rocha SWS, França M, Rodrigues GB, Barbosa KPS, Nunes AKS, Pastor AF, Oleveria AGV, Oleveria WH, Luna RLA, Peixoto CA, 2014. Diethylcarbamazine reduces chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride-(CCl 4-) Induced Liver Injury in Mice, *Mediators of Inflammation*, 696383, 15.
- Rottenberg M, Castaños-Velez E, Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P, Orn A, 1996. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (İNOS): Evidence for dual pathway of iNOS induction, *European Journal of Immunology*, 26, 12, 3203-3213.
- Santos FR, Vieira PM, Correa-Oliveira R, Giunchetti RC, Carneiro CM, Reis AB, Malaquias LC, 2011. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*, *Parasitol Research*, 108, 6, 1397-403.
- Şahin İ, Yazar S ve Yaman O, 2008. Kayseri-karpuzsekisi havzasında yaşayan insanlarda *Fasciola hepatica* prevalansı, *Journal of Health Sciences*, 17, 2, 97-103.
- Şimşek S, Çeribaşı AO, Ütük A, 2004. *Dicrocoelium dendriticum*'un koyun karaciğerinde yaptığı tahribatın morfolojik ve histopatolojik olarak incelenmesi, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28, 4, 189-191.
- Taylor CR, Cote RJ, 1994. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*, Saunders Company, 214-222.
- Tousson E, Beltagy DM, Gazia MA, Al-Behbehani B, 2012. Expressions of p53 and CD 68 in mouse liver with *Schistosoma mansoni* infection and the protective role of silymarin, *Toxicology and Industrial Health*, 29, 8, 761-770.
- WHO, 2014. Foodborne trematode infections. http://www.who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/en/ (Erişim Tarihi: 28.07.2015).
- Wynn TA and Barron L, 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin. Liver Diseases*, 30, 245-257.