

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDA PARAZİTER KAYNAKLI KARACİĞER FİBROZİSİNDE
İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER**

Veteriner Hekim Ayhan AKGÜN
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatma İLHAN

VAN-2015

Bu araştırma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2015-SBE-YL077 no'lu proje ile desteklenmiştir.

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOYUNLARDA PARAZİTER KAYNAKLI KARACİĞER FİBROZİSİNDE
İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER**

Veteriner Hekim Ayhan AKGÜN
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Sevil Atalay VURAL

Üye
Doç. Dr. Fatma İLHAN

Üye
Yrd. Doç. Serkan YILDIRIM

TEZ KABUL TARİHİ

02/09/2015

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın danışman hocam Doç. Dr. Fatma İLHAN'a, enfektif dokuların makroskopik tanısında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, çalışmanın önemli bir parçası olan parazit tespitinde yardımları olan Parazitoloji Anabilim Dalında görev alan Doç. Dr. Nalan ÖZDAL'a, Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zabit YENER'e, Anabilim Dalı hocalarıma, Patoloji Anabilim Dalı teknik personeline, tez çalışmama mali destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına ve her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	V
Tablolar Listesi.....	VI
Şekiller Listesi.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Karaciğer Fibrozisi.....	3
2. 1. 1. Karaciğer fibrozisinin paraziter sebepleri.....	4
2. 1. 2. Histopatolojik inceleme.....	6
2. 1. 3. İmmunhistokimyasal inceleme.....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3. 1. Örneklerin Toplanması.....	9
3. 2. Patolojik İnceleme.....	9
3. 2. 1. Doku kesitlerinin hazırlanması.....	9
3. 2. 2. İmmunperoksidaz yöntem.....	9
4. BULGULAR.....	11
4. 1. Makroskobik Bulgular.....	11
4. 2. Mikroskobik Bulgular.....	15
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
ÖZET.....	39
SUMMARY.....	40
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

HBV	:	Hepatit B Virüsü
HCV	:	Hepatit C Virüsü
α-SMA	:	α -Smooth Muscle Actin
NO	:	Nitrik Oksit
HCC	:	Hepatosellüler Karsinom
COX	:	Siklooksijenaz
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
ROS	:	Reaktif Oksijen Metabolitleri
TGF	:	Transforming Growth Factor
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
PDGF	:	Platelet Derived Growth Factor
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
TİMP	:	Matriks Metalloprotein İnhibitörleri
ATP	:	Adenozintrifosfat
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	:	İndiklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	:	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ECM	:	Ekstrasellüler Matriks
HE	:	Hematoksilen-Eozin
ABK	:	Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks
PBS	:	Phosfat Buffer Solüsyonu
AEC	:	3-Amino-9-Etil-Carbazol
MNH	:	Mononükleer Hücre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	İmmunhistokimya için kullanılan antikorların özellikleri.....	10
Tablo 2.	Histopatolojik ve immunhistokimyasal bulgular	17

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Karaciğer yüzeyinde yer alan diffuz beyaz-grimsi fibrotik odaklar ve dolgun safra kesesi.....	11
Şekil 2.	Karaciğerde fibrozis.....	12
Şekil 3.	Karaciğer yüzeyinde yer alan diffuz beyaz grimsi odaklar. Kesit yüzeyde safra kanal duvarı kalınlaşması.....	12
Şekil 4.	Karaciğer kesit yüzeyinde safra kanal duvarı kalınlaşması. Kollangitis.....	13
Şekil 5.	<i>Dicrocoelium dentriticum</i> ile enfeste karaciğer.....	13
Şekil 6.	<i>Fasciola hepatica</i> ile enfeste karaciğer (oklar).....	14
Şekil 7.	<i>Cysticercus tenuicollis</i> ile enfeste karaciğer.....	14
Şekil 8.	Portal bölgede meydana gelen bilier fibrozis (oklar) ve MNH infiltrasyonu, bar: 200 µm, HE.....	18
Şekil 9.	Portal bölgede bilier fibrozis (oklar), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	18
Şekil 10.	Hepatositleri saran diffuz fibrozis (oklar), düzensiz hepatosit kordonları (a) ve MNH (b), bar: 200 µm, HE.....	19
Şekil 11.	Diffuz fibrozis (oklar) ve düzensiz hepatosit kordonları (a), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	19
Şekil 12.	Karaciğerde fibrozis (oklar), MNH infiltrasyonu (a) ve rejeneratif nodüller, bar: 200 µm, HE.....	20
Şekil 13.	Parankim bölgede meydana gelen rejeneratif nodüller (a) ve rejeneratif nodülü çevreleyen yoğun fibrozis (oklar), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	20

Şekil 14.	Portal bölgede yer alan safra kanal proliferasyonu (oklar), safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a) ve MNH infiltrasyonu (b), bar: 200 µm, HE.....	21
Şekil 15.	Portal bölgede yer alan safra kanal proliferasyonu (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	21
Şekil 16.	Safra kanalının lumenine yerleşen erişkin parazit ve yumurtası. Safra kanalı bez epitellerinde proliferasyon (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, HE.....	22
Şekil 17.	Safra kanalının lumenine yerleşen erişkin parazit, safra kanalı bez epitellerinde proliferasyon (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	22
Şekil 18.	Parankim bölgede oluşmuş granülom. Granülom içinde dev hücreler (a), granülomu çevreleyen bağ doku proliferasyonu (oklar) ve MNH infiltrasyonu (b), bar: 200 µm, HE.....	23
Şekil 19.	Granülomu çevreleyen bağ doku proliferasyonu (oklar), bar: 200 µm, Masson Trikrom.....	23
Şekil 20.	Parankimde eozinofil ve lenfosit infiltrasyonu (a), bar: 200 µm, HE.....	24
Şekil 21.	Eozinofil ve lenfosit infiltrasyonu (a), bar: 50 µm, HE.....	24
Şekil 22.	Sağlıklı kontrol karaciğer, bar: 100 µm, Masson Trikrom.....	25
Şekil 23.	Karaciğer fibrozisi. Proliferasyona uğramış α-SMA myofibroblastlar, bar: 500 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	25

Şekil 24.	Granülomu çevreleyen kuvvetli α -SMA immunpozitif myofibroblastlar (oklar), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	26
Şekil 25.	Portal bölgede proliferasyona uğrayan myofibroblastlarda(oklar) ve damar düz kas hücrelerinde (a) kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi, bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	26
Şekil 26.	Kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi (a), bar: 200 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	27
Şekil 27.	Kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	27
Şekil 28.	Granülomdaki yabancı cisim dev hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli iNOS immunreaktivitesi (ok), bar: 20 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	28
Şekil 29.	Granülomdaki makrofajlar ve yabancı cisim dev hücrelerinde iNOS immunreaktivitesi (ok), bar: 20 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	28
Şekil 30.	iNOS immünpozitif makrofajlar ve yabancı cisim dev hücreleri (ok), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	29
Şekil 31.	Sitoplazmaları iNOS immunpozitif dev hücreleri (ok), bar: 50 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	29
Şekil 32.	iNOS immunpozitif yabancı cisim dev hücreleri (ok), bar: 50 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	30
Şekil 33.	iNOS immunpozitif makrofajlar (oklar), bar: 50 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	30
Şekil 34.	Damar endotel hücrelerinde İNOS immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.....	31

Şekil 35.	p53 pozitif apoptotik hepatositler (oklar), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	31
Şekil 36.	Safra kanalı ve çevresinde oluşan granülomda p53 immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	32
Şekil 37.	Myofibroblastlarda ve damar düz kas hücrelerinde COX-2 immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	32
Şekil 38.	Kuvvetli COX-2 immunreaktivitesi, bar: 200 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	33
Şekil 39.	Granülom çevresinde PCNA pozitif lenfositler, bar: 200 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	33
Şekil 40.	Lenfositlerde PCNA immunreaktivitesi (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	34
Şekil 41.	PCNA pozitif proliferen safra kanal epitel hücre çekirdekleri (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.....	34

1. GİRİŞ

Karaciğerde fibrozis, karaciğerin kronik hasara karşı gösterdiği bir reaksiyondur. Fibrozis yangısal hücre infiltrasyonu ve yoğun kollajen içeren ekstrasellüler matriks birikimi ile karakterize kompleks bir olaydır (Bataller ve Brenner, 2005; Rockey ve Friedman, 2007; Golbar ve ark., 2013). İlerleyici fibrozis siroza dönüşebilir. Tüm karaciğerde, diffuz rejeneratif nodüler fibrotik lezyonlara sebep olur. Bu durum karaciğer yetmezliğini oluşturur. Erken dönemde fibrozis geri dönüşümlü iken siroz geliştiğinde kalıcı hale gelir (Jubb ve ark., 1992; Jones ve ark., 1997; Bataller ve Brenner, 2005; Wynn ve Barron, 2010).

Karaciğer fibrozisi çeşitli endojen ve ekzojen sebeplerle oluşmaktadır. İnsanlarda çoğunlukla viral hepatitler, koyun ve sığırlarda ise genellikle paraziter nedenlerden kaynaklanmaktadır (Balkaya ve ark., 2010). Akut hepatit olgusu, kronik hepatit ve siroza kadar devam edebilen hastalıklar tablosuna dönüşebilmektedir (Uluoğlu, 1990; Kumar ve ark., 2014). Karaciğer sirozu, dünyada ve ülkemizde insanlarda en sık görülen 10 ölüm sebebinden birisidir. Sirozun en önemli iki nedenini alkol alışkanlığı ve viral hepatitler oluşturmaktadır. En fazla kronik hepatit yapan viral etkenler Hepatit B virüsü (HBV) ve Hepatit C virüsü (HCV) dür (Kumar ve ark., 2014). Ancak çoğunlukla koyun ve sığırların karaciğer trematodu olarak bilinen *Fasciola spp.* insanlarda da enfeksiyon oluşturmaktadır (Cordova ve ark., 1998; Benzer, 2003). Fasioliiazis; *Fasciola hepatica* ve *Fasciola gigantica* tarafından oluşturulan gıda kaynaklı zoonoz bir hastalıktır. Hayvanlarda görülen fasioliiazis tüm dünyada yaygın ve önemli bir hastalıktır. İnsanlarda ise 1990'lı yıllardan sonra fasioliiazisli vakalar artmaya başlamıştır (Mas-Coma ve ark., 2005; McManus ve Dalton, 2006; Şahin ve ark., 2008; WHO, 2014). Dünya Sağlık Teşkilatına göre en az 2.4 milyon insan infekte ve milyonlarca insanda risk altındadır (WHO, 2014). Bolivya, İran, Mısır, Peru, Portekiz ve Fransa gibi ülkelerde, koyun ve sığırla teması olan insanlarda daha yoğun görülmektedir. Bu yerlerde ekonomik gelişme ve sosyal yapıyı da etkileyen çok önemli bir sağlık problemi olarak dikkati çekmektedir (Moghadami ve Mardani, 2008).

Karaciğerde şekillenen hasarlar sonucu sitokinlerin etkisiyle aktive olan karaciğer stellat hücreleri karaciğer fibrozisinde önemli rol oynarlar. Tip I kollajen üreten bu hücreler alfa düz kas aktin (α -SMA) pozitifdirler (Taylor ve Cote, 1994;

Mendes ve ark., 2010; Golbar ve ark., 2013; Marinković ve ark., 2013). Bakteri endotoksinleri, protozoa ve parazit antijenleri ile uyarılan makrofajlar çok fazla miktarda nitrik oksit (NO) üreterek bakteri, parazit, tümör hücresi gibi yabancı hücrelerde sitotoksik etki gösterir. Bu nedenle NO infeksiyonların seyrinin belirlenmesinde, sepsiste ve yara iyileşmesinde rol oynar (James 1995; Türköz ve Özerol, 1997; Brunet 2001). Sirozun en ciddi komplikasyonlarından birisi de hepatosellüler karsinom (HCC) gelişimidir. HCC'nin % 90'ı sirotik zeminde gelişir. Siklooksijenaz (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 fibroze 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; Özdil, 2008). p53 hücre siklus kontrolü, hücre differensiyasyonu, apoptozis, Deoksiribonükleik asit (DNA) tamiri ve sentezi olaylarında önemli rol alır. Hasarlı genlerde DNA proliferasyonu durdurarak veya hücreyi apoptozise uğratarak çözüm sağlar. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), hücre proliferasyonlarında ve tümoral olgularda ortaya çıkan bir proteindir (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 ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Karaciğer parazitlerinin hem hayvanlarda hemde son yıllarda insanlarda sıklıkta görülmesi kronik hepatitis 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.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Karaciğer Fibrozisi

Karaciğer vücudun en büyük metabolik merkezidir. Karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasında önemli görevleri vardır. Karaciğerin fonksiyonel ünitesi hegzagonal şekilli lobüllerdir. Herbir karaciğer lobülünü, ortasında vena sentralisi bulunan ve hepatositlerden oluşan hücre kordonları oluşturur. Karaciğerde hepatositler, damar endotel hücreleri, kupffer hücreleri, stellat hücreler ve safra kanalı epitel hücreleri bulunmaktadır (Kömürcü 2011; Tucer 2008). Karaciğerin sabit makrofajları olan kupffer hücreleri, enflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokin üretir. Oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin (ROS) kaynağıdır. ROS'un oluşturduğu etkiyi nötralize etmek üzere NO üretimi de yapar. Aktive kupffer hücreler Transforming growth factor- β (TGF- β) sentezler. Karaciğer kupffer hücrelerinden sentezlenen TGF- β 1, stellat hücreleri aktive ederek kollajen üreten myofibroblastik hücrelere dönüşümünü sağlar. Daha önceleri yağ depolayan hücreler, lipositler, perisinüzoidal hücreler ya da İTO hücreleri olarak bilinen karaciğer stellat hücreleri karaciğer yıkımlanması sonucu fibrozis oluşumunda önemli rol oynarlar. Perisünüzoidal, subendotelyal bölgede hepatositlerin üzerinde yer alan yıldızimsı uzantıları olan mezenkimal kökenli hücrelerdir (Temel ve Gökçimen 2002; Bataller ve Brenner, 2005; Tucer, 2008).

Sirozun başlangıç evresi olan karaciğer fibrozisi, kollajen içeren ekstrasellüler matriks birikimi ile karakterizedir. Birçok kronik karaciğer hastalığında şiddetli karaciğer zedelenmesi sonucu şekillenebilir (Bataller ve Brenner, 2005; Kayadibi ve Sertoğlu, 2014). Karaciğer stellat hücreleri karaciğerde oluşan hasarlar sonucu TGF- β , endotelin 1, anjiotensin II, leptin, interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor; PDGF) gibi çeşitli sitokinlerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve çeşitli toksinlerin etkisiyle aktifleşip tip I kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerini üreten myofibroblast benzeri hücrelere dönüşür. Normal karaciğerde stellat hücreleri disse aralığında yerleşmiştir ve inaktiftir. Karaciğer hasarının oluşmasıyla aktive olan stellat hücrelerinde proliferasyon ve migrasyon şekillenir. Tamir yapılan bölgelere göç eden hücreler buralarda birikir ve bol miktarda kollajen içeren ekstrasellüler matriks sentezler. Fibrozisin temel yapısını

oluşturan kollajen madde, başlangıçta daha çok disse aralıklarında birikir. Eğer fibrozisi oluşturan sebep ortadan kaldırılırsa olgunlaşmamış kollajen, enzimatik parçalanma yardımı ile ortamdaki uzaklaştırılır. Akut karaciğer yıkımlanmasından sonra parankimal hücreler rejenerer olur ve nekrotik ya da apoptotik hücrelerin yerini alır. Sağlıklı karaciğerde, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve matriks metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP), ekstrasellüler matriksin yapım ve yıkımını sürekli denge halinde tutarlar. Eğer karaciğerdeki yıkımlanma kalıcı ise bu denge bozulur rejenerasyon yetersiz kalır. Hepatositlerin yerini fibröz kollajen içeren ekstrasellüler matriks alır. Fibröz kollajen materyalin dağılımı karaciğerdeki yıkımlanmanın sebebine bağlı olarak değişir. Örneğin kronik viral hepatitler ve kronik safra bozukluklarından kaynaklı bozukluklarda fibröz doku çoğunlukla portal aralıkta yerleşir. Fibrozis sadece portal aralıkta gelişmişse bilier fibrozis adını alır. Fibrozis parankimde şekillenen yıkımlanmaya bağlı olarak şekillenir ve retiküler ağ yıkımlanıp portal aralıklar yaklaşarak düzensiz nedbe dokusu oluşursa buna postnekrotik nedbeleşme denir. Diffuz parankimal fibrozisinde kronik parankim yıkımlanmasına bağlı olarak fibrozis yavaş gelişir ve portal aralıkları vena sentralisler ile birleştirir. Primer zedelenme vena sentralisler çevresinde ise fibrozis vena sentralisler çevresinde yoğunlaşır buna perasiner fibrozis adı verilir. Sebep ortadan kaldırılamazsa zamanla tüm karaciğer fibrotik doku ile kaplanır, rejenerasyon nodülleri gelişir ve karaciğer küçülür (Jubb ve ark, 1992; Friedman, 2000; Bataller ve Brenner, 2005; Guyot ve ark., 2006; Kömürcü 2011).

2. 1. 1. Karaciğer fibrozisinin paraziter sebepleri

Koyunların karaciğerinde bulunan parazitlerden *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dentriticum* ve *Cysticercus tenuicollis* değişen şiddette hepatitise sebep olur. Karaciğer kelebekleri dünyanın pek çok bölgesinde görülen ruminantların en önemli helmintleridir. *Fasciola hepatica*, koyun ve sığır başta olmak üzere birçok evcil ve yabani memelide yaygın şekilde görülür (Aytuğ ve ark., 1990; Jubb ve ark, 1992). Tüm dünyada yaygın olan etken insanlarda da enfestasyonlara yol açabilmektedir. Son yıllarda insanlarda görülen fasioliiazis vakalarının hızla çoğalmasından dolayı fasioliiazisin önemi artmaktadır (Mas-Coma ve ark., 2005; Mendes ve ark., 2010; WHO, 2014). Son konaklar enfektif metaserkerleri ağız yoluyla alarak hastalığa yakalanırlar.

İnce bağırsaklarda kistten çıkan genç parazitler, bağırsak duvarını delerek peritona ve buradan da karaciğere ulaşırlar. Karaciğer kapsülünü delerek parankime giren genç parazitler, burada bir göç dönemi geçirdikten sonra, safra kanallarına geçerler. Etkenin erişkin formu safra kanallarında bulunur. Bazı trematodlar da vena porta yoluyla ya da safra kanallarından karaciğere ulaşır. Akut dönemde, karaciğer parankiminde göç eden larvalara bağlı olarak tüneller şeklinde travmatik lezyonlar oluşturur. Karaciğerin kesit yüzeyindeki bu tüneller 2-3 mm çapında kanama alanları şeklindedir. Tünellerin son kısmında 1 mm'den küçük genç parazitlere rastlanır. Ağır enfestasyonlarda, karaciğer koyu renkte kanamalı çizgiler ve odaklarla bezeli durumda olabilir. Doku artıklarından temizlenmiş olan eski göç yolları eozinofil infiltrasyonundan dolayı açık sarı renktedir. Akut olgularda, histopatolojik olarak kanama alanları, eozinofil, makrofaj, nötrofil ve dejenere hepatositler görülür. İyileşme granülasyon dokusuyla olur. Bu doku lenfosit ve eozinofillerce zengindir. Hafif enfestasyonlarda nedbe dokuları gözden silinebilir. Kronik form, genç parazitlerin safra kanallarına ulaşması ile başlar. Genç parazitler safra kanallarında olgunlaşıp erişkin forma geçerler ve yumurta oluşturmaya başlarlar. Bu dönemde parazitlerin yaptığı irkiltiye bağlı olarak safra kanalı duvarlarının kalınlaştığı gözlenmektedir. Bu yumurtaların safraya salınması ile yumurtalar safra yolu ile barsağa ulaşır. Oradan dışkı ile dışarı atılarak çevreyi enfekte ederler. Erişkin formları çok uzun yıllar yaşar (Jubb ve ark., 1992; Balkaya ve ark., 2010; Tınar ve ark., 2011; WHO, 2014). Ağır enfestasyonlarda nedbe dokuları birbiriyle birleşerek karaciğerde düzensiz fibrozise yol açar. Birçok bölgede yangısal fibrozis parankim dokunun yerini alır. İlerleyen karaciğer fibrozisinin siroza dönüşmesi, karaciğerde diffuz nodüler lezyonların oluşmasıyla karaciğer yetmezliği sonucu kilo kaybı, et ve süt veriminde azalma ve son aşamada infertiliteye sebep olur (Golbar ve ark., 2013; Khanjari ve ark., 2014; WHO, 2014). *Fasciola hepatica*'nın sebep olduğu fasioliazis; Asya; Avrupa, Amerika, Avustralya ve Yeni Zellanda'da bulunan evcil hayvanların en önemli ve en fazla ekonomik kayba sebep olan paraziter hastalığıdır. Her yıl milyonlarca dolarlık ekonomik kayba sebep olmaktadır (Golbar ve ark., 2013; Khanjari ve ark., 2014; WHO, 2014).

Dicrocoelium dentriticum kedi dışında tüm evcil hayvanlarda bulunsa da en çok koyun, keçi ve sığırlarda görülür. Karaciğerde kolangiohepatitise yol açar. Karaciğerde lezyonun şiddeti ve yaygınlığı parazitin sayısı ile ilgilidir. Bazı olgularda bu sayı

binlerce olur. Enfestasyonun başlangıcında karaciğerin periferinde hafif fibrozis başlar. Uzun süren şiddetli enfestasyonlarda yaygın bilier fibrozis oluşur. Histolojik değişiklikler fasioliyazise benzer (Gül ve ark., 1990; Jubb ve ark, 1992; Şimşek ve ark., 2004; Tınar ve ark., 2011; Khanjari ve ark., 2014).

Cysticercus tenuicollis, evcil hayvanlarda önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Özellikle koyunlarda karaciğer parankiminde geçirdiği olgunlaşma döneminde travmatik lezyonlara yol açar. Bunlar kanama ve nekrotik bölgeler, ilerleyen olgularda fibrozisin artmasıyla nodüler yapılara dönüşür (Jubb ve ark, 1992; Yıldırım ve ark., 2006; Tınar ve ark., 2011). Hepatositlerde dejenerasyon, nekroz, fibrozis ile safra kanallarında hiperplazi, lenfositler hepatitis, granülom ve telangiyektazilere sebep olur (Radfar ve ark., 2014). Şistozomiazis, insanlarda *Schistosoma mansoni*'nin sebep olduğu en önemli paraziter etkenlerden birisidir. Karaciğerde periportal fibrozis ve siroza sebep olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde önemli morbidite ve mortalite sebebidir. İnsanlarda görülen *Opisthorchis viverrini* ve *Clonorchis sinensis* gibi opistorşid karaciğer kelebeklerinin yol açtığı kronik enfestasyonlar ile safra kanalı karsinomları arasında bir bağlantı olduğu bildirilmektedir. Paraziter enfestasyonlarda safra kanalları ve submukoza bezlerinde hiperplazik ya da adenomatöz proliferasyonlar görülmektedir (Jubb ve ark, 1992; Tınar ve ark., 2011; WHO, 2014).

Kronik olgularda parazitli karaciğerler oldukça sert bir kıvama sahiptir. Duvarı kalınlaşan safra kanallarının lümenlerinde çok sayıda parazit etkeni görülür (Balkaya ve ark., 2010). Karaciğerde oluşmuş fibrozis olgusu fokal veya diffuz olabilen kaba ya da ince boz beyaz renkli nodüler lezyonlar halindedir (Jubb ve ark, 1992; Şimşek ve ark, 2004; Balkaya ve ark., 2009).

2. 1. 2. Histopatolojik inceleme

Parazitlerin karaciğerde meydana getirmiş olduğu etkiler genellikle travmatiktir. Karaciğerde fibrozis oluşumunu göç yolları sonrasında meydana getirmektedirler. Parazitlerin safra kanalı yüzeyini irrite ettiği, bu sebeple karaciğer kesit yüzeylerindeki safra kanallarının proliferasyona uğrayarak safra kanallarının duvarlarının kalınlaştığı kaydedilmiştir. Fibrozisin yerleşimi karaciğerde yıkımlanma oluşturan sebebe ve yıkımlanan bölgelere göre değişiklik göstermektedir. İlerleyen olgularda parankimde

yaygın olarak ya da proliferasyon safa kanalları çevresinde yoğun bağdokusu artışı gözlenmektedir (Jubb ve ark., 1992; Şimşek ve ark., 2004; Oruç, 2009; Balkaya ve ark., 2010).

2. 1. 3. İmmunhistokimyasal inceleme

α -SMA, hücre iskeletinin yapısına giren bir proteindir. Myofibroblast farklılaşmasını ortaya koyan önemli bir belirteç olarak bilinir. Fibroziste aktive olan karaciğer stellat hücreleri myofibroblast benzeri hücrelere dönüşerek, α -SMA, c-myb ve myocyte enhancer factor-2 gibi myojenik markırlar için yoğun immunpozitif reaktivite gösterirler (James ve ark., 1999; Wnag ve ark., 2004; Erdoğan, 2010). α -SMA, sağlıklı yetişkin karaciğerinde çok az sayıda hücrede pozitifken, fibroziste bağ dokusu proliferasyonunda çok yoğun immunpozitifdir (Erdoğan, 2010).

İNOS serbest radikaldir. Antimikrobiyal, yangı önleyici, sitotoksik ve sitostatik fonksiyonlara sahiptir. Organizmada bakteriyel, viral, protozoon, helmint veya fungal bir enfeksiyon şekillendiğinde aşırı miktarlarda üretilir (James 1995, Brunet 2001). Bakteri, parazit gibi pekçok patojenin Adenozintrifosfat (ATP) üreten oksidatif fosforilasyonun, glikolizinin ve TCA siklusunun demir içeren bazı enzimlerini inhibe ederek etkeni ortadan kaldırırlar. NO L-arjinin aminoasidinden O₂ molekülünün de yer aldığı bir takım fizyolojik olayla NO sentaz (NOS) enzimi yardımıyla sentezlenir. Nöronal NOS (nNOS; tip-I), indüklenebilen NOS (İNOS; tip-II) ve endotelial NOS (eNOS; tip-III) olmak üzere üç tip NOS enzimi mevcuttur (Ergün ve Ergün, 2009). nNOS ve eNOS dokularda fizyolojik süreçte inaktif olarak bulunurken, iNOS serbest bir radikal olup fizyolojik durumlarda bulunmaz. Yangı gibi bazı patolojik durumlarda başta makrofaj olmak üzere, nötrofil ve damar endotellerinde sentez edilmektedir (Türköz ve Özerol, 1997; Karakaya ve ark., 2000). Bu hücrelerde İNOS'un sentezi spesifik sitokinlerin etkisiyle hücrelerin aktivasyonu sonucu oluşur (Türköz ve Özerol, 1997).

Karaciğerde fibrozisin gelişimi bir yara iyileşmesidir. Ancak tüm yara iyileşmelerinde bir iyileşme, tamir süreci vardır ve tamir sonunda mümkün olduğunca az hasarla doku onarılır. Kronik yangı ve takibinde gelişen fibrozis karaciğerde ciddi bozukluklara sebep olur. Karaciğer fibrozisinin en ileri aşaması sirozdur ve sirozun da

pek çok komplikasyonunun nedeni karaciğerde gelişen fibrozistir (Özdil 2008; Golbar ve ark., 2013). Kronik hepatitlerde en önemli enzimlerden birisi COX enzimidir. Yangının başlaması ve devamında anahtar enzimlerdendir. Bu nedenle 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, anjiogenezi artırarak ve apoptozisi inhibe etmek suretiyle HCC oluşumuna katkıda bulunur. Yapılan az sayıdaki çalışmada COX-2'nin artan karaciğer fibrozisiyle birlikte dokuda arttığı gösterilmiştir (Özdil 2008; Rocha ve ark., 2014).

p53, kromozom 17p üzerinde lokalize olan bir genidir. Tümör baskılayıcı olarak bilinmektedir. p53 hücre siklusunun kontrolü, DNA sentezi ve tamiri, hücre differensiyasyonu ve apoptoziste önemli görevi vardır (Özbilim ve ark., 1997). Diğer genlerin promotör bölgelerine bağlanarak ekspresyonunu kontrol altına alır. Bir genin hasar alımında p53 çoğalmaya başlar (Özdemir, 1998; Kapucuoğlu ve ark., 2001). p53 proteini DNA hasarı, hipoksi, viral enfeksiyonlar ve tümörler gibi çeşitli stres durumlarında artmaktadır (Taylor ve Cote, 1994). Hepatitis B virüs ve aflatoksin maruz kalarak oluşan hepatosellüler karsinomlarda, p53 protein birikiminin yoğun olarak şekillendiği bildirilmektedir (Qi ve ark., 2014). Hepatosellüler karsinomlarda p53 değişime uğrayan gen olarak bilinir. p53, hepatosellüler karsinomlarda 17p13 DNA bağlanma bölgesinde değişimlere sebep olmaktadır. p53 varlığının saptanması ile hepatosellüler karsinom varlığını doğrulamaktadır (Seydel, 2011).

PCNA, nükleer proteindir. Hücre proliferasyonunun başlamasında rol oynamaktadır. İmmunhistokimyasal çalışmalarda PCNA, proliferatif aktivitede yaygın kullanılan bir belirteçdir. PCNA derecesi mitotik aktivite ve dolayısıyla tümörün derecesi arasında korelasyon olduğunu göstermektedir (Taylor ve Cote, 1994; Kır ve ark., 2006; Karahan ve ark., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Örneklerin Toplanması

Van Büyükşehir Belediye Mezbahasında kesilen ve kesim sonrasında makroskopik incelemede kronik paraziter hepatitis bulguları gösteren 30 adet koyuna ait karaciğer dokusu ile makroskopik olarak sağlıklı görünen 10 adet koyuna ait karaciğer dokusundan histopatolojik ve immunhistokimyasal incelemeler amacıyla örnekler alındı.

3. 2. Patolojik İnceleme

3. 2. 1. Doku kesitlerinin hazırlanması

Histopatolojik ve immunhistokimyasal değerlendirme amacıyla alınan karaciğer dokuları %10'luk tamponlu formalin'de 48-72 saat tespit edildikten sonra, akan çeşme suyunda 6-8 saat yıkandı. Rutin doku takibinde alkol (70°, 80°, 90°, 96 °ve 100°) ve ksilol serilerinden geçtikten sonra parafinde bloklandı. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için alınan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ve Masson Trikrom ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Histopatolojik bulgular lezyonun şiddetine göre -: negatif , +: hafif, ++: orta ve +++: yoğun olarak değerlendirildi.

3. 2. 2. İmmunperoksidaz yöntem

İmmunhistokimyasal inceleme için diğer yöntemlere göre daha duyarlı olduğu bildirilen Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABK) immunperoksidaz yöntemiyle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (Taylor ve Cote, 1994). Çalışmada Scytek (EmergoEurope, ScyTek Laboratories, AAA125, Logan, Utah USA) kiti kullanıldı. 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, pH 7.2) ile 5 dk. yıkandı. COX-2, p53, iNOS primer antikorları için antijen retrieval kullanıldı. Kesitler çekirdekteki antijen maskelenmesini önlemek amacıyla antijen retrieval (sitrata buffer, ph 6.1) solüsyonu içerisinde, 5'er dk. süreyle 4 kez mikrodalga fırında ısıya tabii tutuldu. Mikrodalga fırından çıkarıldıktan sonra 30 dk. oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda distile su ile yıkayıp, kesitlerin etrafı kurulandı. PBS ile 5 dk. yıkayıp, % 0. 3'lük H₂O₂ de (100 ml metanol+0.3 ml H₂O₂) 10 dk. tutularak, endojen

peroksidaz inaktive edildi. PBS de 5-10 dk. yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikolarla uyumlu olan protein blok ile 5 dk. inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solusyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan primer antikolar damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece +4°C'de bekletildi. PBS ile 2 kez 5'er dk. yıkanıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkube edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere AEC (3-amino-9-etil-carbazol) kromojen, damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilende 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Su bazlı yapıştırıcı kullanılarak lamelle kapatıldı (Taylor ve Cote, 1994).

İmmunhistokimyasal inceleme için primer antikor olarak, fibroziste artan bağ doku artışını göstermek için mezenkim hücreler/myofibroblastları boyayan α -SMA, karaciğer tümörlerinin temelinde fibrozis ve sirozun olması kanser prekürsörü lezyonlar ile kanser hücrelerinde artması ve yara iyileşmesinde rol alması yönünden COX-2, artan mitozun değerlendirilmesinde PCNA, apoptozis için p53; paraziter enfeksiyonlarda makrofajlarda salınması yönünden iNOS kullanıldı. İmmunhistokimyasal incelemede kullanılan primer antikoların özellikleri tablo 1'de verildi. Kontrol için alınan kesitlerde de primer antikor yerine PBS kullanıldı. İmmunhistokimyasal incelemede immunreaktif hücrelerin sayısı semikantitatif olarak değerlendirildi.

Negatif – (% 0)

Zayıf boyananlar + (% 1-10)

Orta yoğunlukta boyanma ++ (% 10-50)

Yoğun boyanma +++ (% 50-100) olarak kabul edildi.

Table 1. İmmunhistokimyasal incelemede kullanılan primer antikoların özellikleri

<i>Antikolar</i>	<i>Kökeni</i>	<i>Dilüsyon</i>	<i>Kaynak</i>
COX-2 SP21 *	Rabbit Monoclonal	Hazır dilüsyon	BioGenex
PCNA; PC 10	Rabbit Monoclonal	1:2000	DAKO
p53; Pab 240*	Mouse Monoclonal	1:50	NeoMarkers
iNOS*	Rabbit Polyclonal	1:100	Thermo Scientific
α -SMA 1A4	Mouse Monoclonal	Hazır Dilüsyon	BioGenex

*Antijen retrieval kullanıldı.

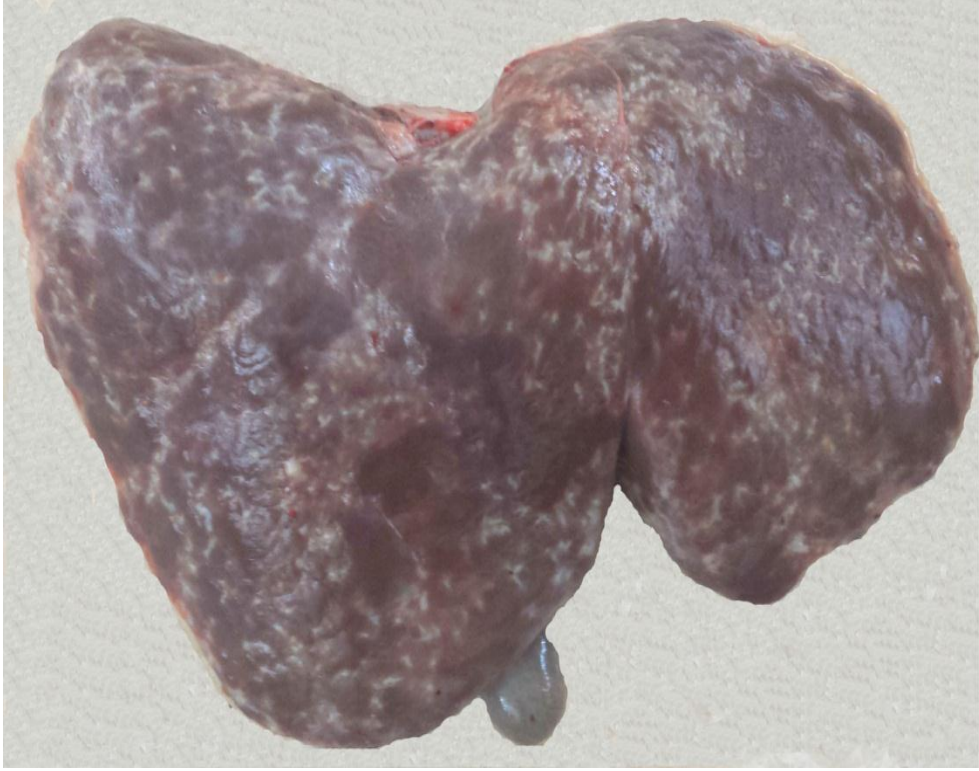
4. BULGULAR

4. 1. Makroskopik Bulgular

Makroskopik incelemede karaciğerlerin yoğun fibrozisten dolayı oldukça sert kıvamda ve soluk renkte olduğu görüldü (Şekil 1-3). Safra kesesi ve safra kanallarının dilate olup duvarlarının kalınlaştığı (Şekil 1-4), bu nedenle safra kanallarının dışardan daha belirgin olarak dikkat çektiği gözlemlendi. Dış yüzeyinde grimsi beyaz sert fibrotik odakların (Şekil 1-3) bulunduğu karaciğerlerin kesit yüzeyinde safra kanalları ve safra kesesinin içinde kahverengimsi müköz eksudat ve erişkin parazit görüldü (Şekil 6). Fibrozisli karaciğerlerin kesit yüzünde çok sayıda küçük kum kelebeği şeklinde olan *D.dentriticum* (Şekil 5) ile kelebek şeklinde *F. hepatica*'lar (Şekil 6) ve karaciğer paranzimine fibröz bir bantla bağlanan *C. tenuicollis* (Şekil 7) görüldü.



Şekil 1. Karaciğer yüzeyinde yer alan diffuz beyaz-grimsi fibrotik odaklar ve dolgun safra kesesi.



Şekil 2. Karaciğerde fibrozis.



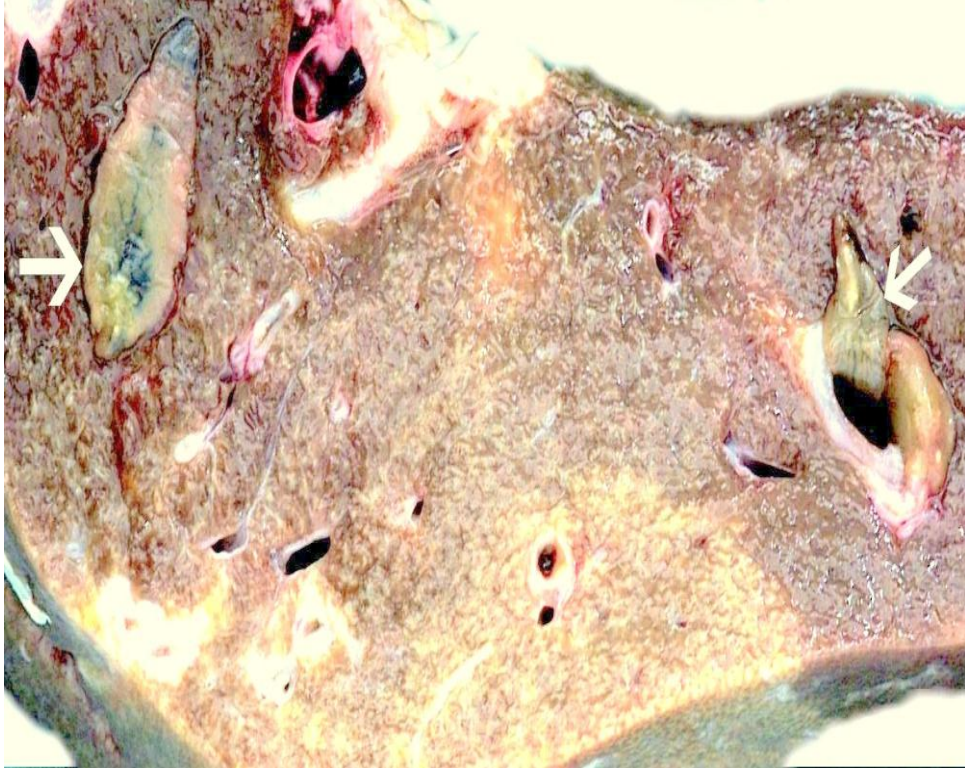
Şekil 3. Karaciğer yüzeyinde yer alan diffuz beyaz grimsi odaklar. Kesit yüzeyde safra kanal duvarı kalınlaşması.



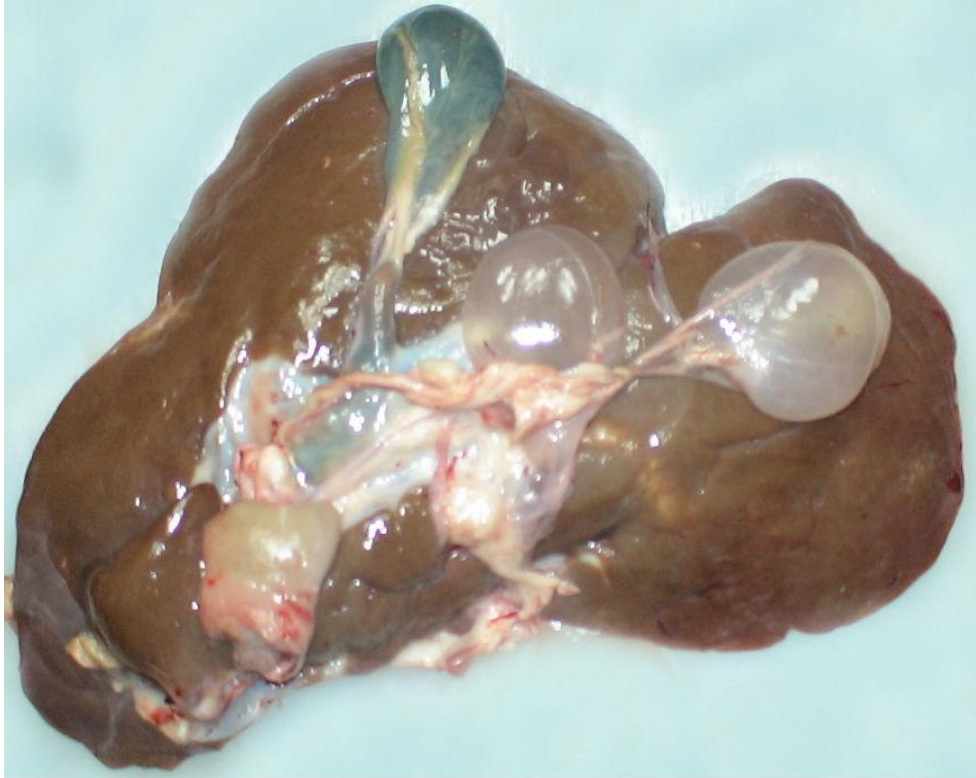
Şekil 4. Karaciğer kesit yüzeyinde safra kanal duvarı kalınlaşması. Kolangitis.



Şekil 5. *Dicrocoelium dentriticum* ile enfeste karaciğer.



Şekil 6. *Fasciola hepatica* ile enfeste karaciğer (oklar).



Şekil 7. *Cysticercus tenuicollis* ile enfeste karaciğer.

4. 2. Mikroskopik Bulgular

Alınan karaciğer kesitlerinin HE ve immunhistokimyasal boyanmaları (α -SMA, İNOS, COX-2, p53 ve PCNA) birbirleriyle ve kontrolleriyle karşılaştırmalı olarak incelendi. Histopatolojik bulgular Tablo. 2’de, immunhistokimyasal bulgular ise Tablo 3’te 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. Hepatositler şişkin, sitoplazmaları granüler ve eozinofilikti. Portal alanda lenfosit, makrofaj ve eozinofilden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu ve fibrozis gözlemlendi (Şekil 8). Masson Trikrom boyası ile fibrozis daha net olarak ortaya konuldu (Şekil 9). 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 (Şekil 10, 11). Merkezde vena sentralisleri bulunmayan rejenerer hepatositlerin oluşturduğu nodüller (pseudolobuluslar-rejeneratif lobül) şekillenmişti (Şekil 12, 13). Fibrozisin yoğun görüldüğü parankimal alanlarda hepatositler arasına sızmış yer yer lenfosit, makrofaj ve eozinofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 12). Safra kanalı epitellerinde hiperplazi ve çevresini saran değişen şiddette MNH infiltrasyonu ile fibrozis gözlemlendi (Şekil 14, 15). Bu safra kanallarının bir kısmında safra kanallarının lumeninde parazitin erişkin formu ve yumurtaları görüldü (Şekil 16, 17). Pembe renkte geniş sitoplazmaya sahip, çok çekirdekli dev hücreleri ve MNH’ler bulunan fibröz doku ile sarılmış granülomlar görüldü (Şekil 18, 19). Granülomlarda yer alan plazma hücrelerinde eozinofilik görünümde Russel cisimcikleri dikkati çekti. Değişen şiddette eozinofil lökosit infiltrasyonlarına diğer MNH infiltrasyonlarıyla birlikte tüm olgularda rastlandı (Şekil 20, 21). Portal alanda artan fibrozisle birlikte kan damarlarında artmıştı. Parankimde değişen şiddette hemosiderozis gözlemlendi. Kontrol grubu olan sağlıklı karaciğerler normal histolojik yapısındaydı (Şekil 22).

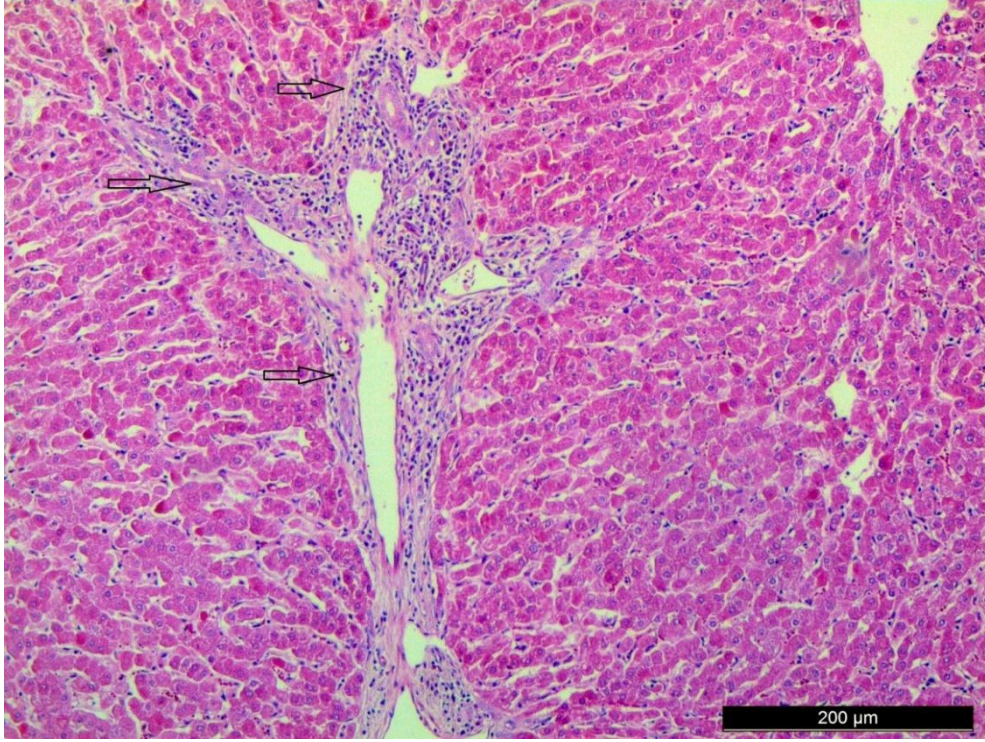
Fibrozisli karaciğer dokularında immunhistokimyasal olarak α -SMA, İNOS, COX-2, p53 ve PCNA araştırıldı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fibrotik karaciğerlerde α -SMA, İNOS, COX-2, p53 ve PCNA da yüksek pozitiflik gözlemlendi.

Fibrotik karaciğerlerde α -SMA'nın proliferen myofibroblastların yoğun olduğu yerlerde belirgin bir şekilde immunpozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 23-27). İNOS ise makrofaj (Şekil 30, 33), dev hücreler (Şekil 28-32) ve damar endotel hücrelerinde pozitif (Şekil 34). p53 hepatosit sitoplazması (Şekil 35) ile granülomlardaki dev hücrelerinde (Şekil 36) pozitif. Myofibroblastlar, damar düz kas hücreleri ve MNH infiltrasyonlarında COX-2 immunpozitif (Şekil 37, 38). Fibroblast, lenfosit (Şekil 39, 40), hepatositlerin çekirdekleri ve safra kanalı epitel hücrelerinde (Şekil 41) PCNA immunpozitif. Kontrol dokularında α -SMA, COX-2, p53 ve PCNA proteinleri çok az sayıda hücrede çok daha hafif şiddette boyanmasına rağmen İNOS immunnegatif.

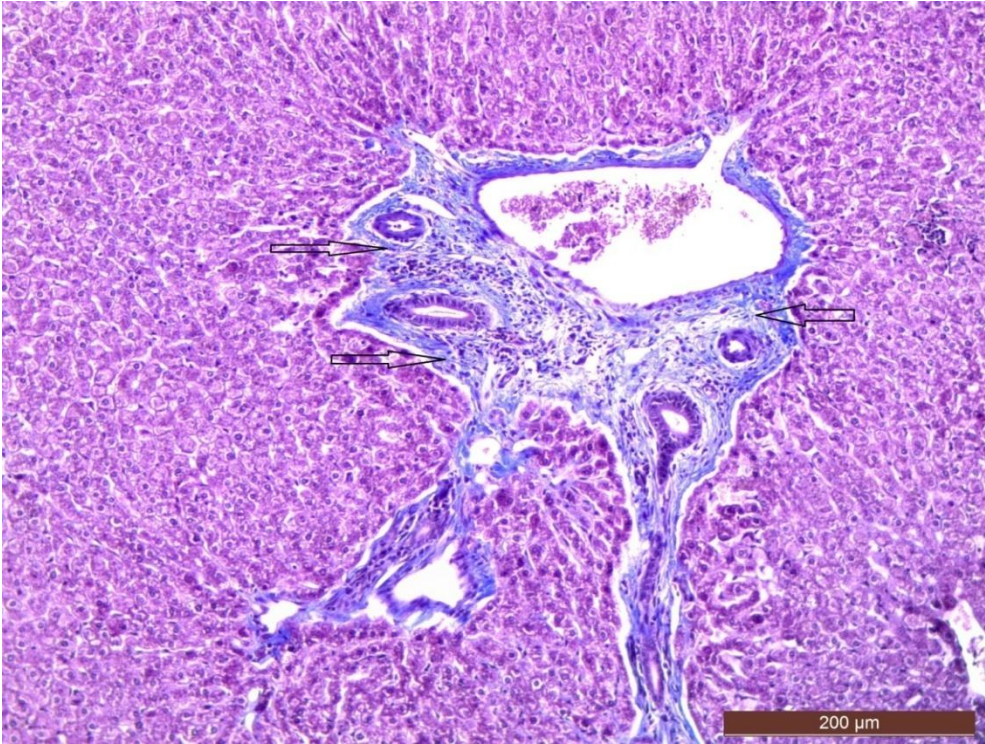
TABLO 1: Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal Bulgular
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

	FİBROZİS						İMMUNHİSTOKİMYASAL BULGULAR				
	Bilier Fibrozis	Diffuz Fibrozis	Safra kanalı proliferasyonu	Nekroz-Dejenerasyon	MNH infiltrasyonu	Eozinofil lökosit inf	α -SMA	iNOS	COX-2	PCNA	p53
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*	++	-	+	+	+	+++	++	++	+	+	++

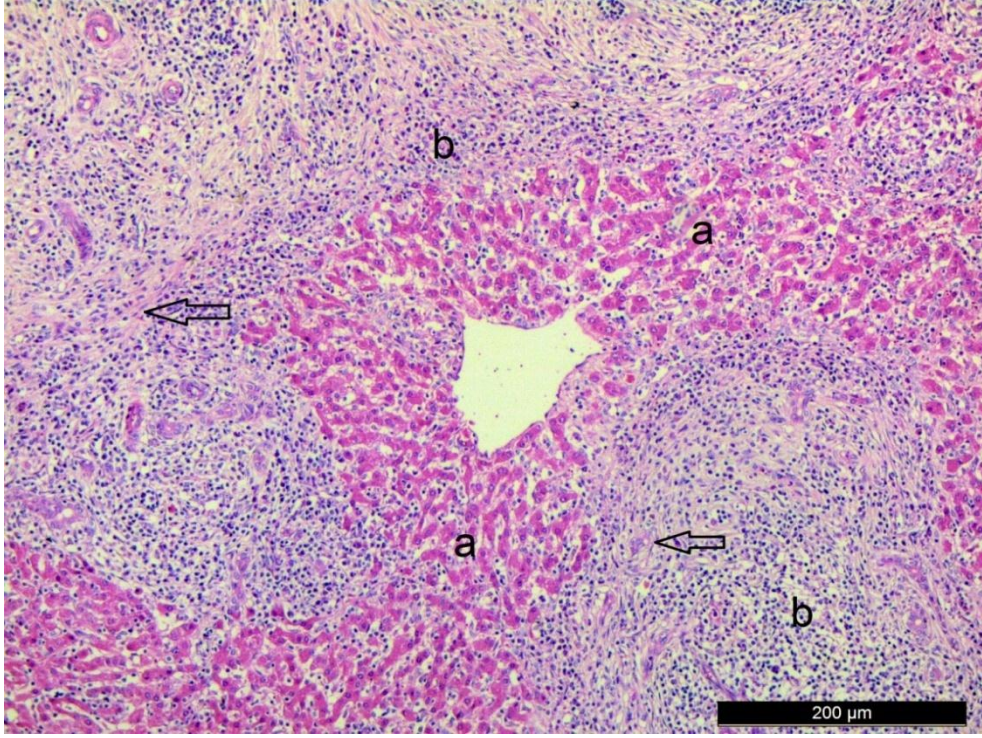
(*) İşaretli olgularda granülom bulunmaktadır. (^a) işaretli olgularda ise sirozlu vakalardır.



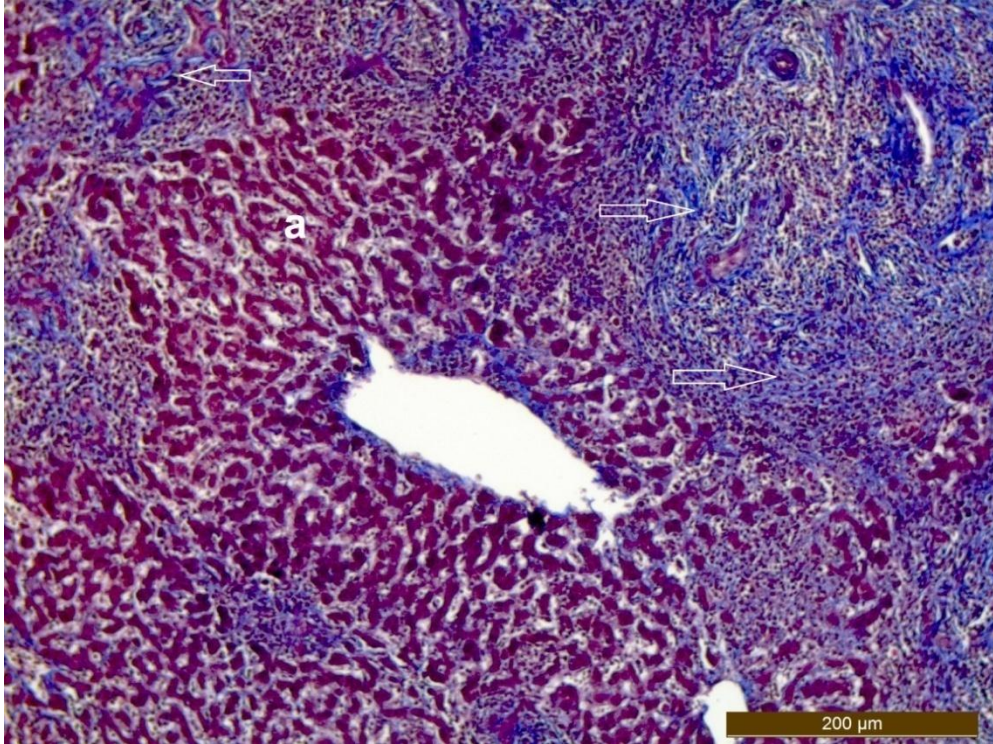
Şekil 8. Portal bölgede meydana gelen bilier fibrozis (oklar) ve MNH infiltrasyonu, bar: 200 μm, HE.



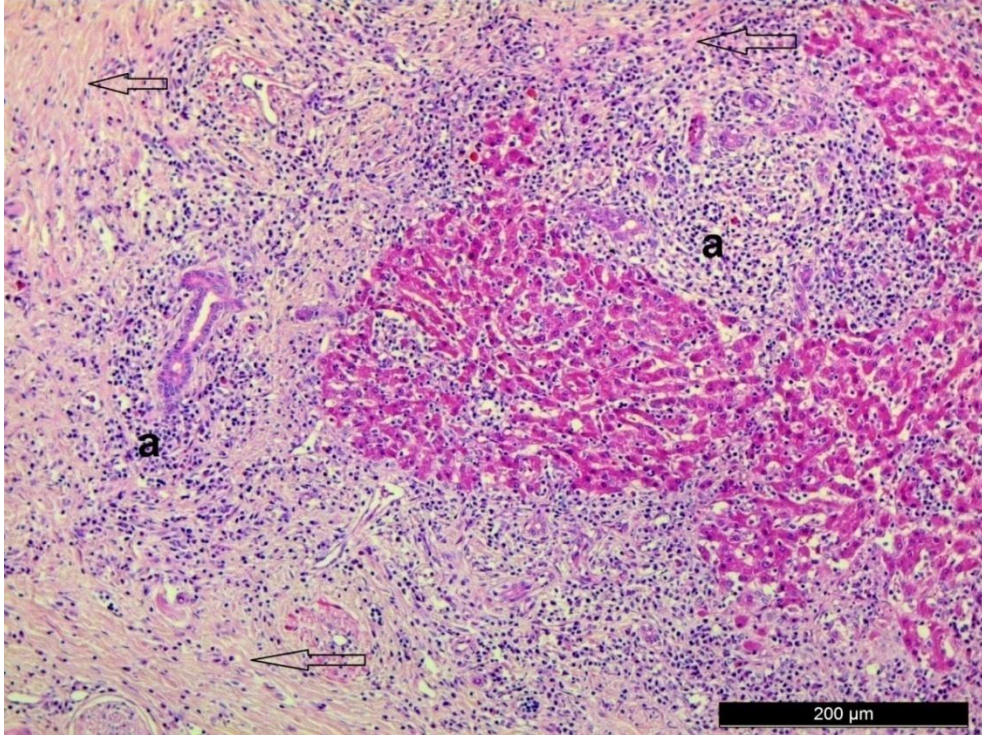
Şekil 9. Portal bölgede bilier fibrozis (oklar), bar: 200 μm, Masson Trikrom.



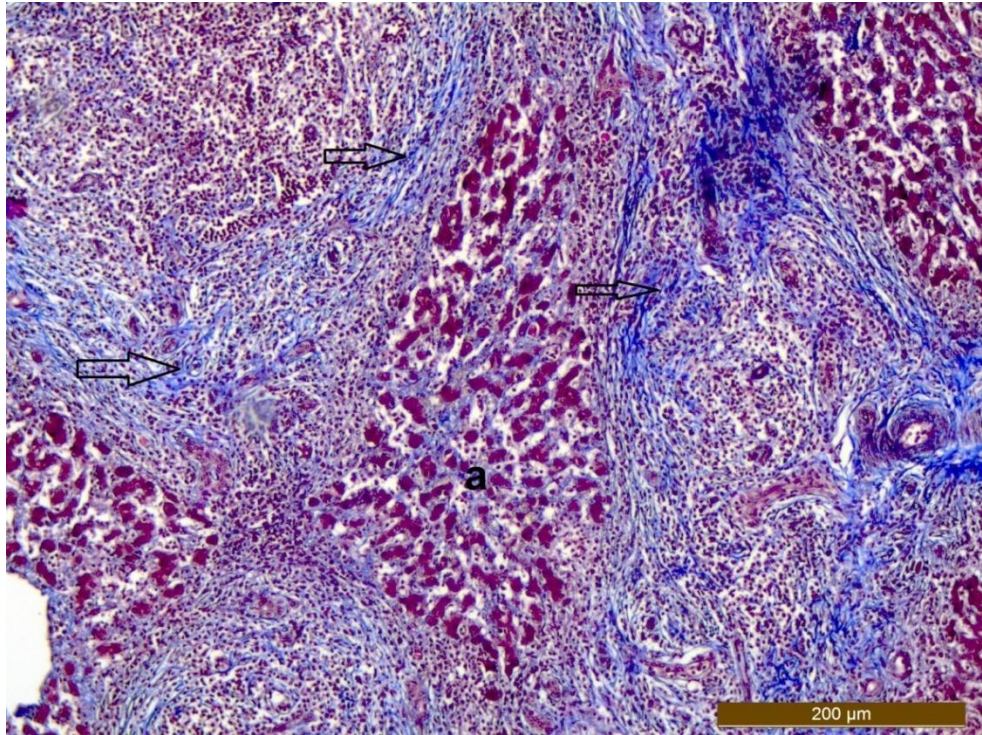
Şekil 10. Hepatositleri saran diffuz fibrozis (oklar), düzensiz hepatosit kordonları (a) ve MNH (b), bar: 200 μm, HE.



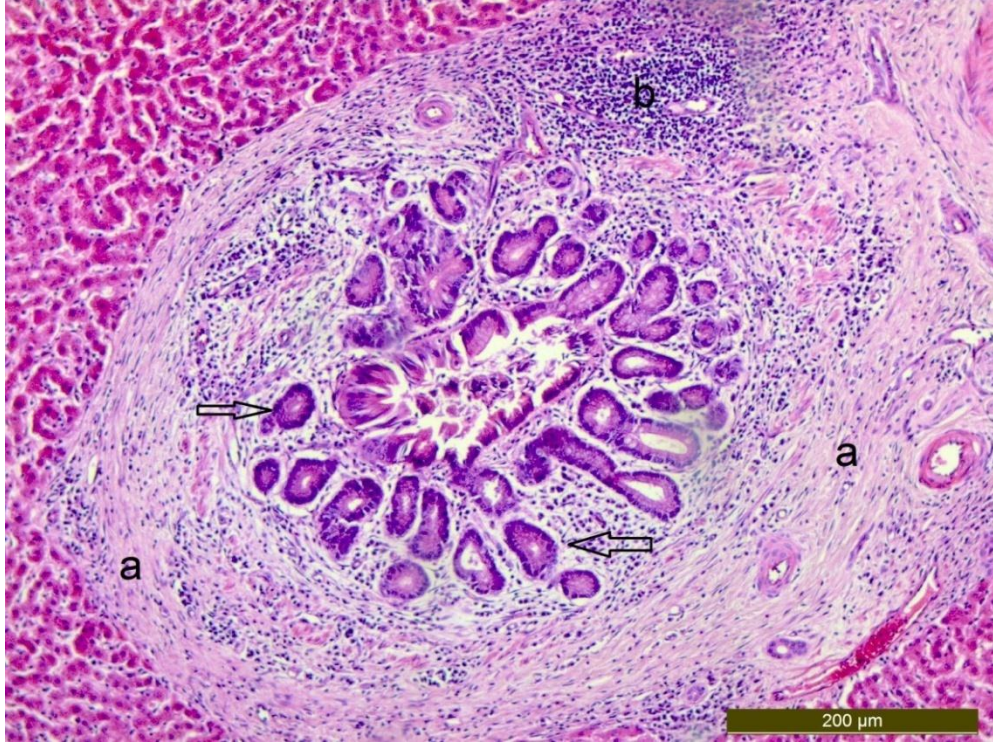
Şekil 11. Diffuz fibrozis (oklar) ve düzensiz hepatosit kordonları (a), bar: 200 μm, Masson Trikrom.



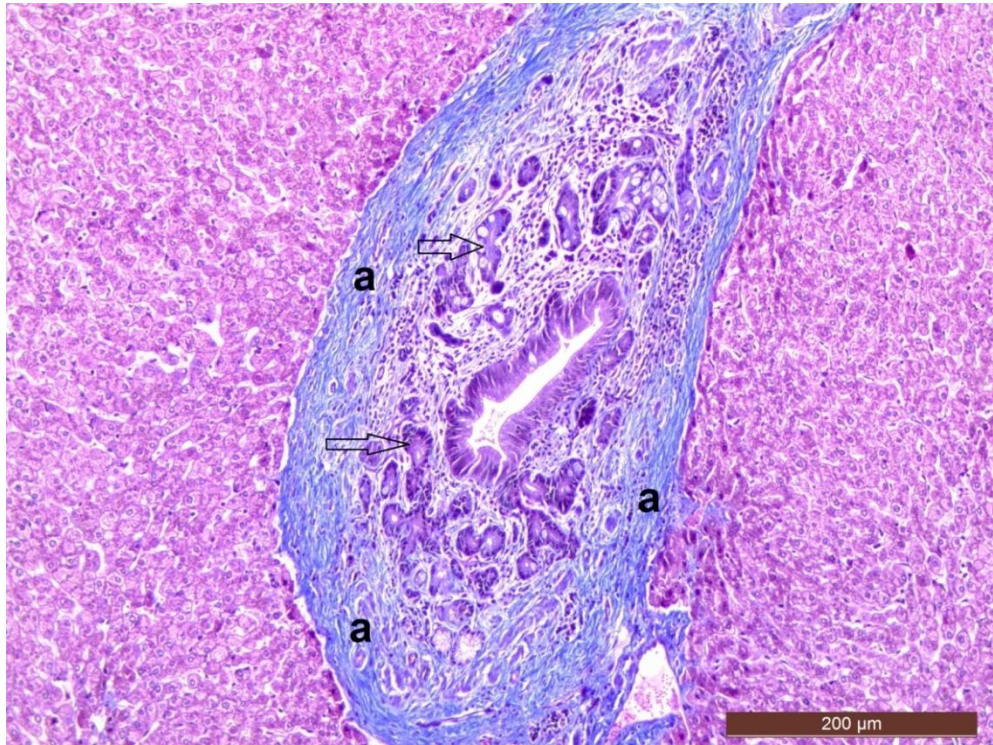
Şekil 12. Karaciğerde fibrozis (oklar), MNH infiltrasyonu (a) ve rejeneratif nodüller, bar: 200 µm, HE.



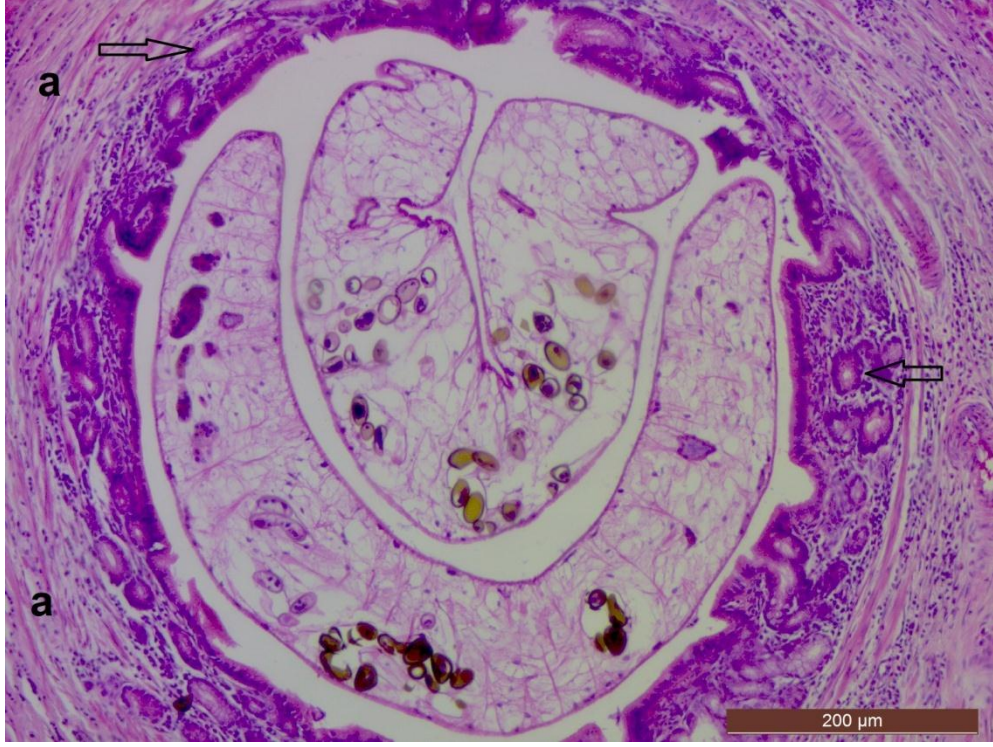
Şekil 13. Parankim bölgede meydana gelen rejeneratif nodüller (a) ve rejeneratif nodülü çevreleyen yoğun fibrozis (oklar), bar: 200 µm, Masson Trikrom.



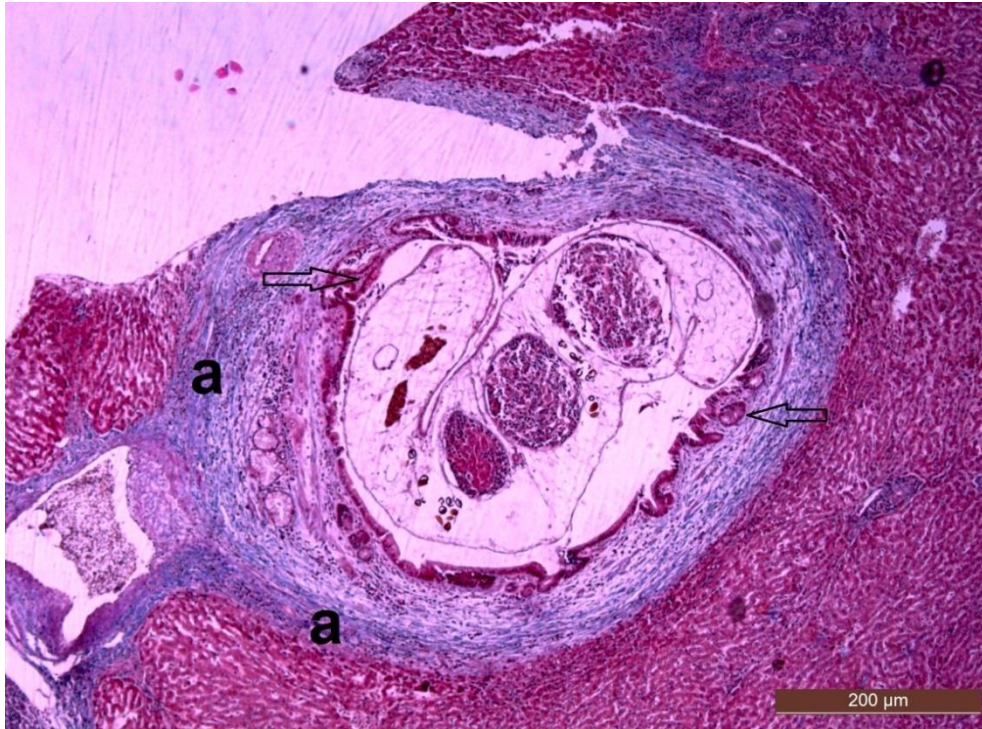
Şekil 14. Portal bölgede yer alan safra kanal proliferasyonu (oklar), safra kanallarını çevreleyen bağdoku proliferasyonu (a) ve MNH infiltrasyonu (b), bar: 200 µm, HE.



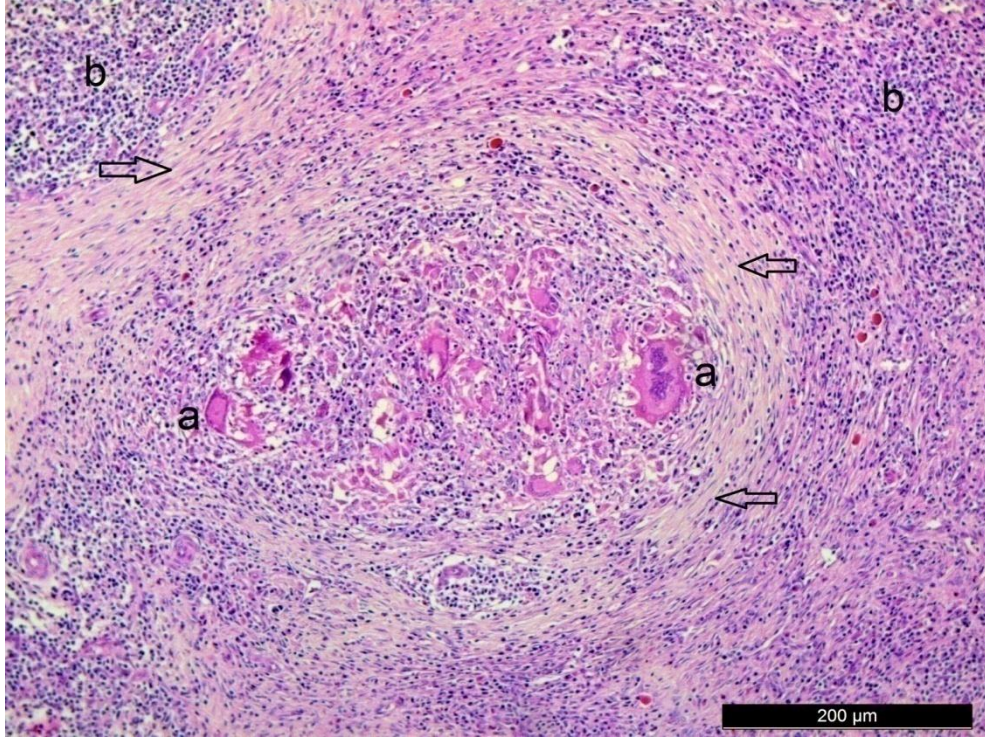
Şekil 15. Portal bölgede yer alan safra kanal proliferasyonu (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, Masson Trikrom.



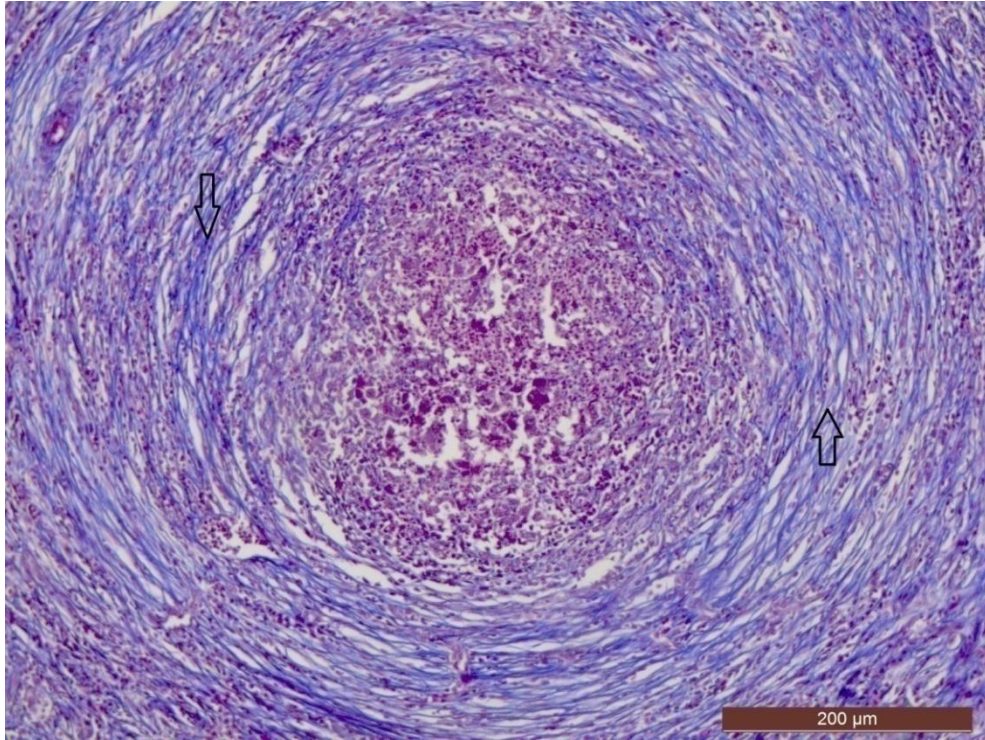
Şekil 16. Safra kanalının lumenine yerleşen erişkin parazit ve yumurtası. Safra kanalı bez epitellerinde proliferasyon (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, HE.



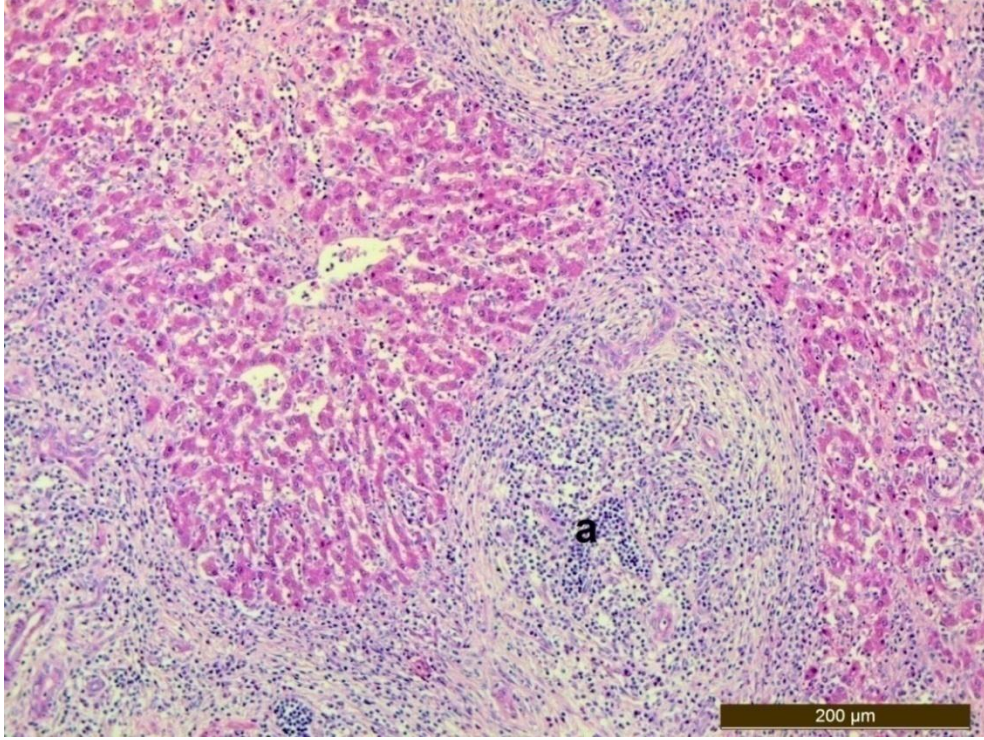
Şekil 17. Safra kanalının lumenine yerleşen erişkin parazit, safra kanalı bez epitellerinde proliferasyon (oklar) ve safra kanallarını çevreleyen bağ doku proliferasyonu (a), bar: 200 µm, Masson Trikrom.



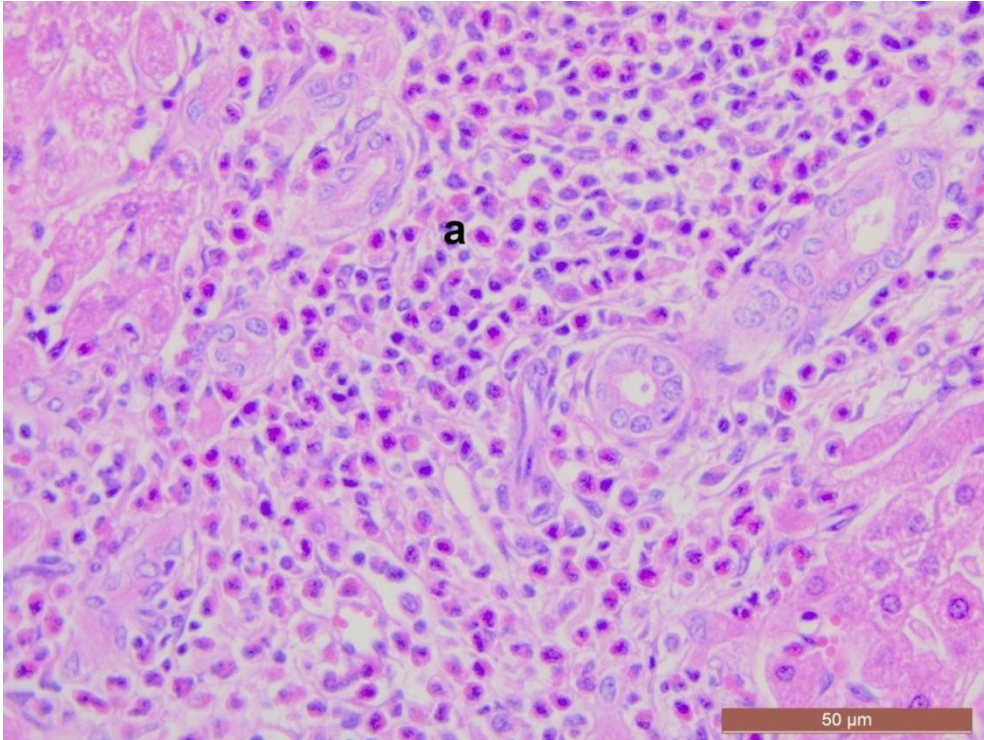
Şekil 18. Parankim bölgede oluşmuş granülom. Granülom içinde yerleşmiş dev hücreler (a), granülomu çevreleyen bağ doku proliferasyonu (oklar) ve MNH infiltrasyonu (b), bar: 200 µm, HE.



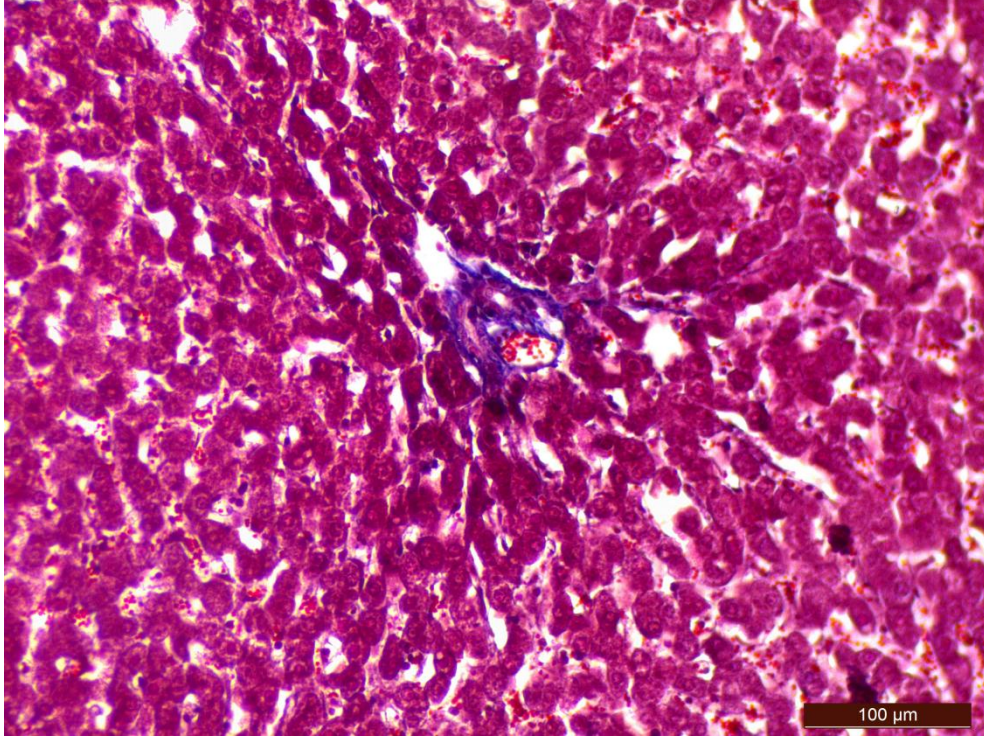
Şekil 19. Granülomu çevreleyen bağ doku proliferasyonu (oklar), bar: 200 µm, Masson Trikrom.



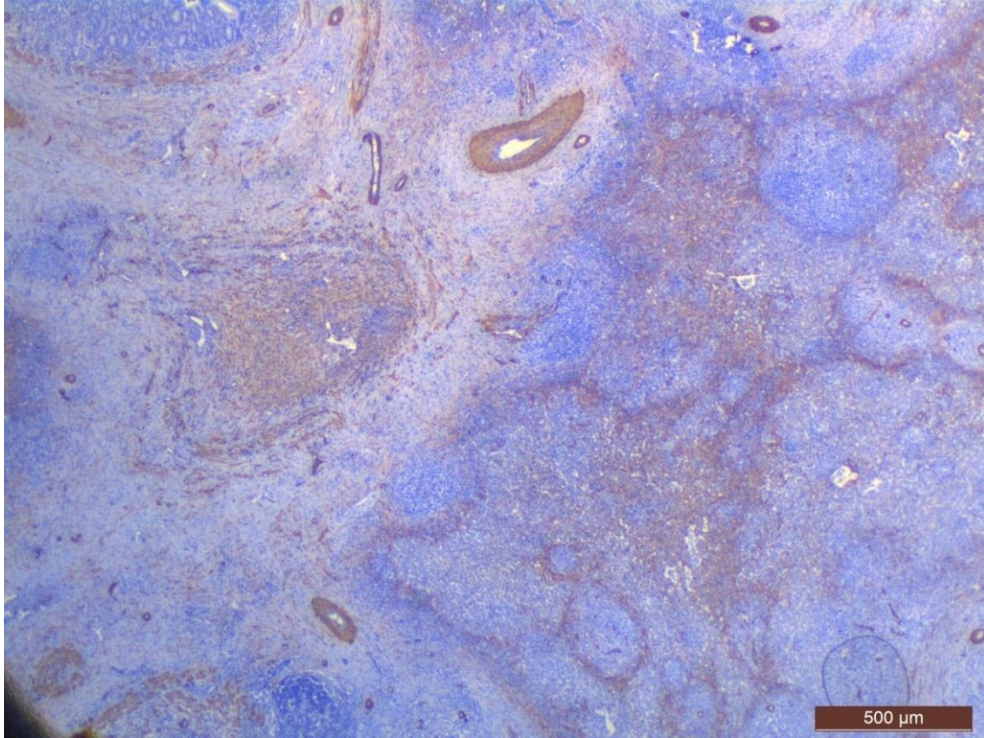
Şekil 20. Parankimde eozinofil ve lenfosit infiltrasyonu (a), bar: 200 µm, HE.



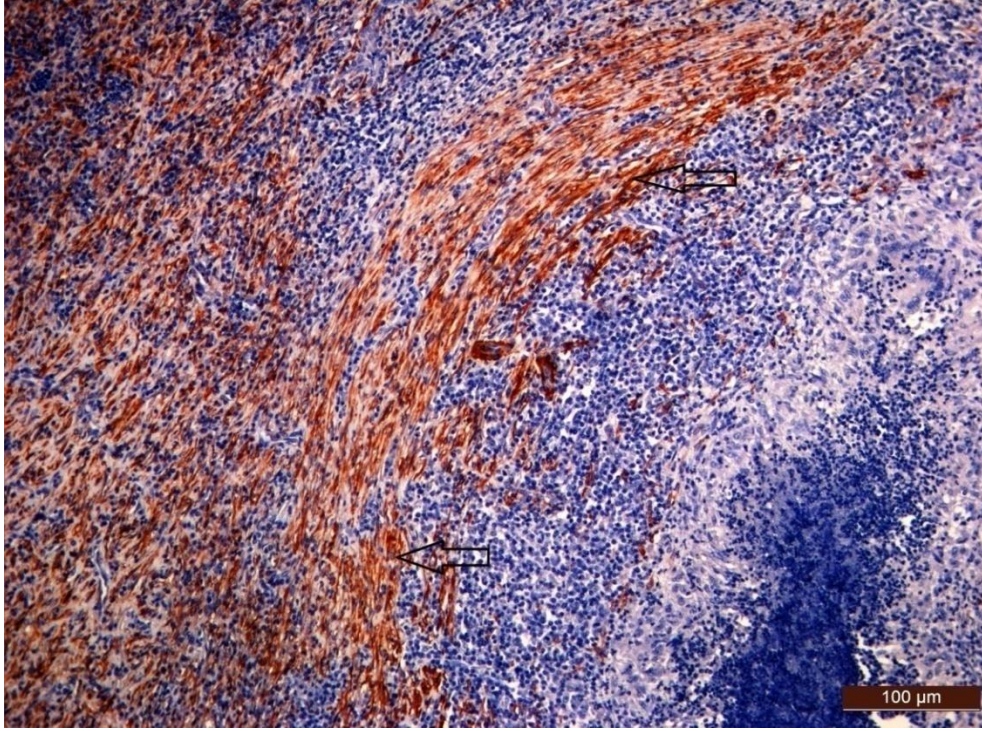
Şekil 21. Eozinofil ve lenfosit infiltrasyonu (a), bar: 50 µm, HE.



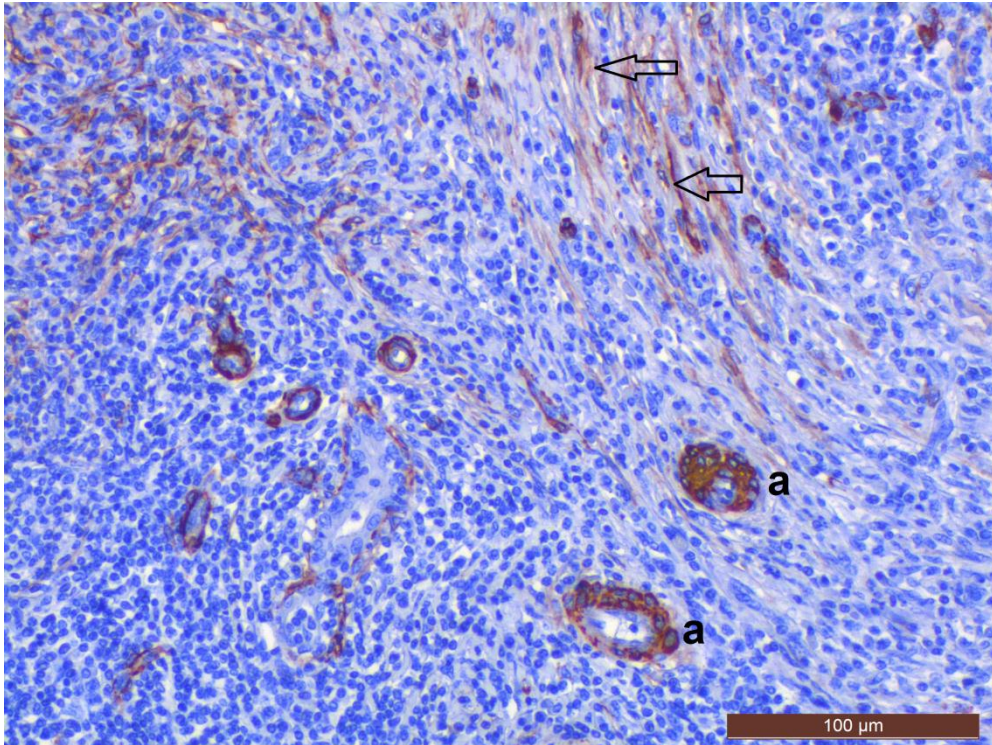
Şekil 22. Sağlıklı kontrol karaciğer, bar: 100 µm, Masson Trikrom.



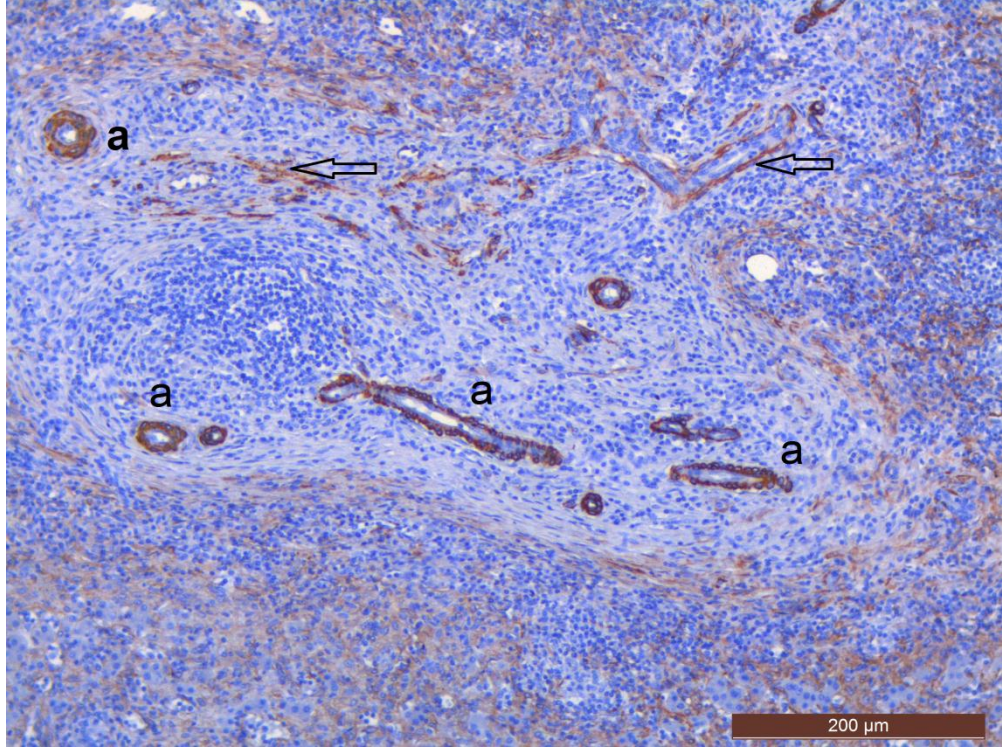
Şekil 23. Karaciğer fibrozisi. Proliferasiyona uğramış α -SMA immunpozitif myofibroblastlar, bar: 500 µm, İmmunperoksidaz boyama.



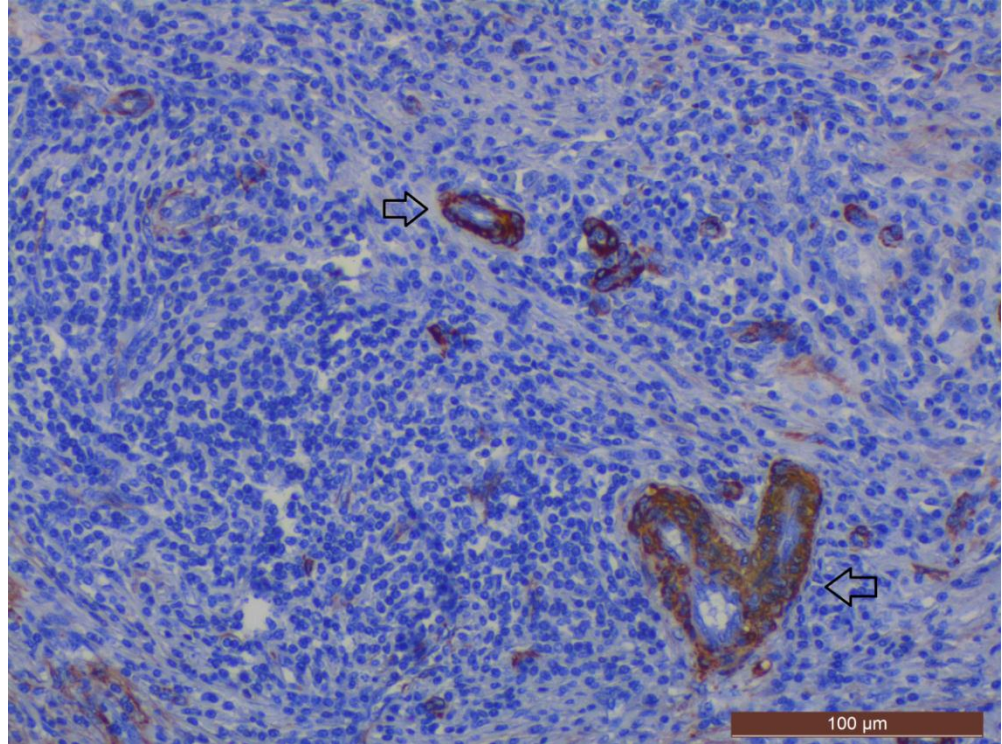
Şekil 24. Granülümü çevreleyen kuvvetli α -SMA immunpozitif myofibroblastlar (oklar), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.



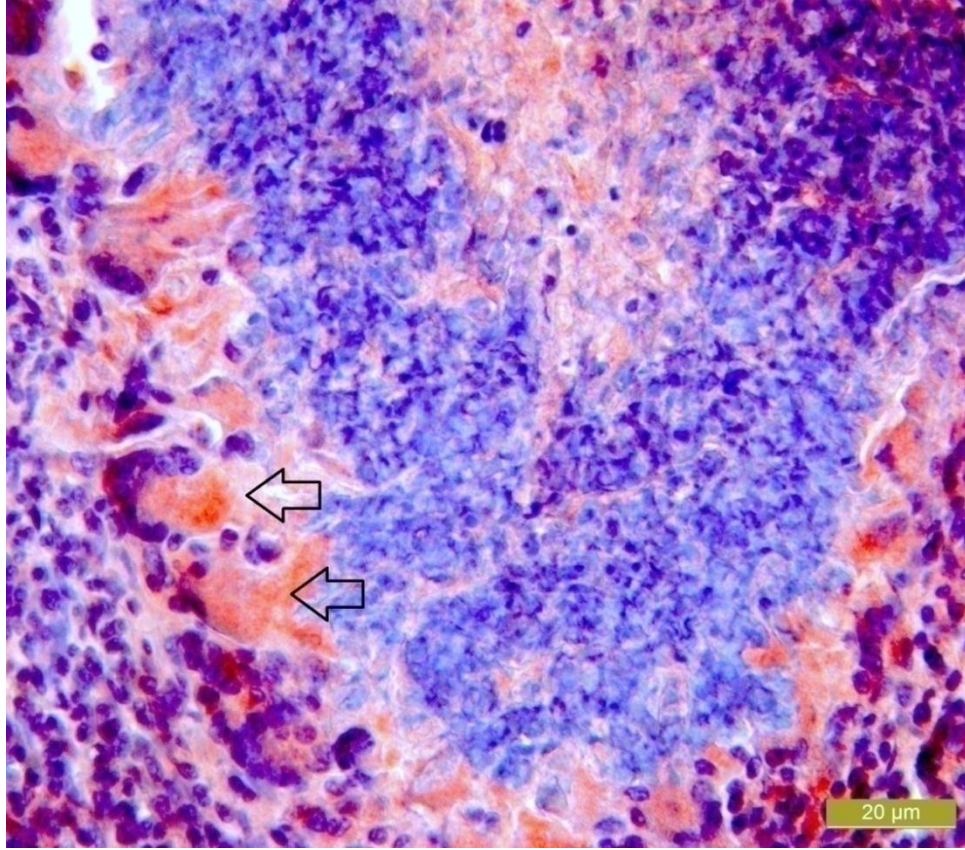
Şekil 25. Portal bölgede proliferasyona uğrayan myofibroblastlarda (oklar) ve damar düz kas hücrelerinde (a) kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi, bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.



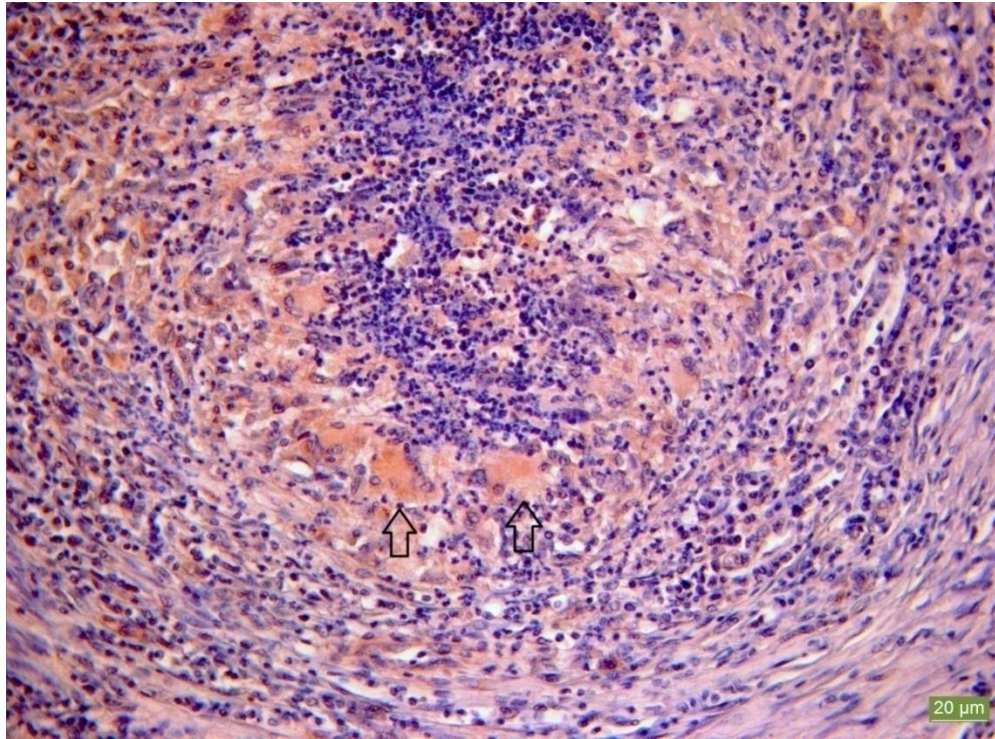
Şekil 26. Kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi (a), bar: 200 μ m, İmmunperoksidaz boyama.



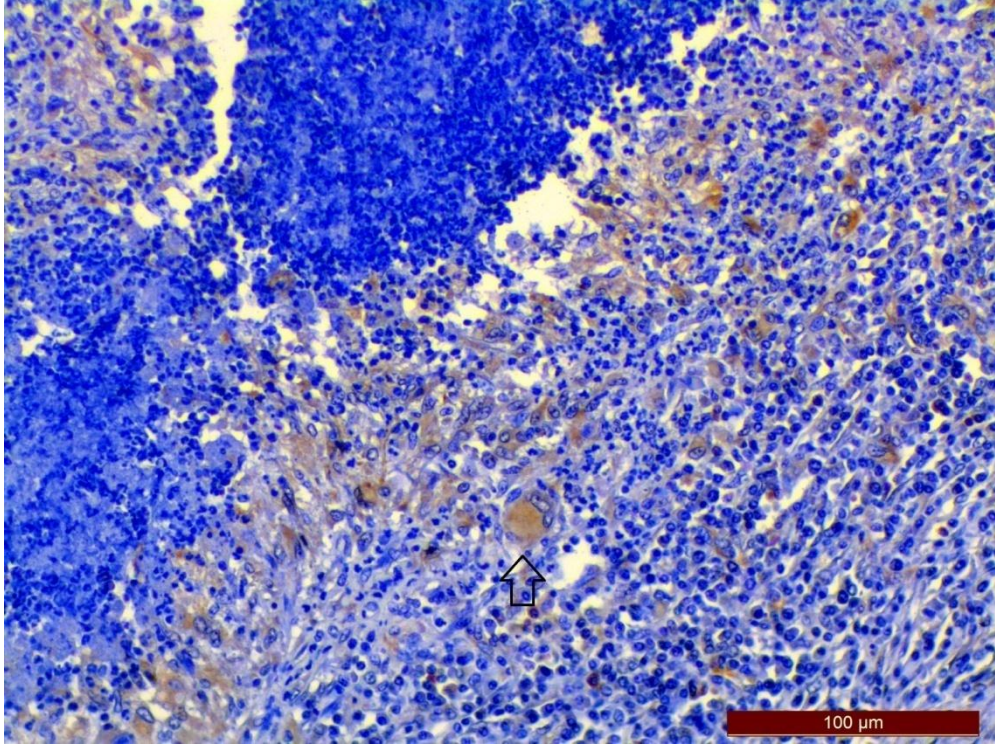
Şekil 27. Kuvvetli α -SMA immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 μ m, İmmunperoksidaz boyama.



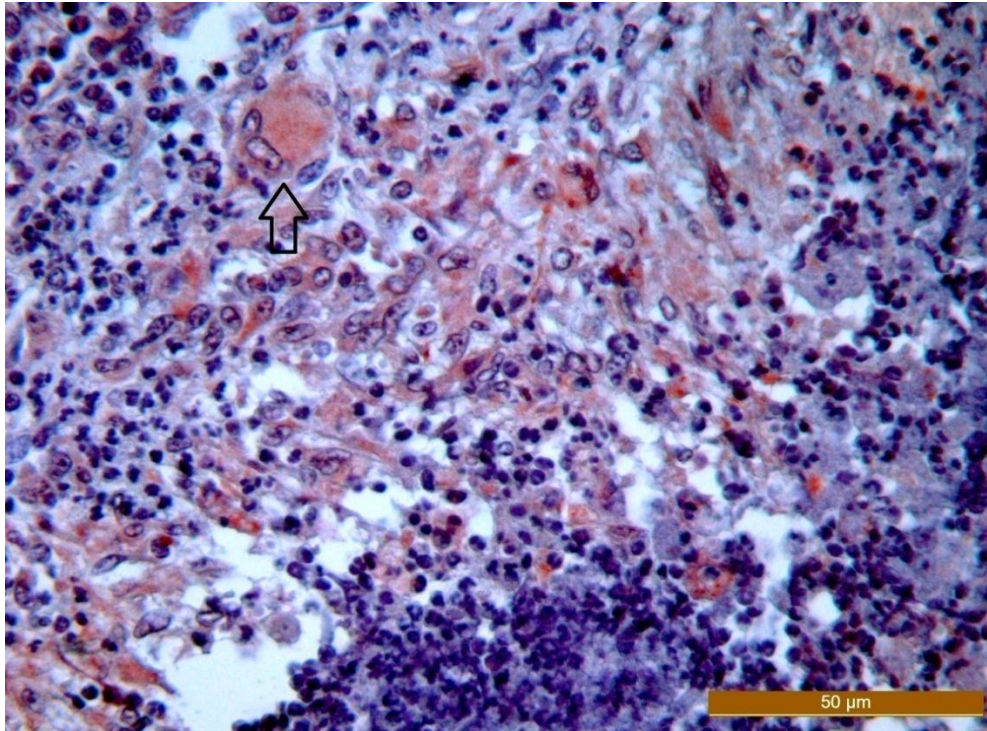
Şekil 28. Granülomdaki yabancı cisim dev hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli iNOS immunreaktivitesi (ok), bar: 20 μm , İmmunperoksidaz boyama.



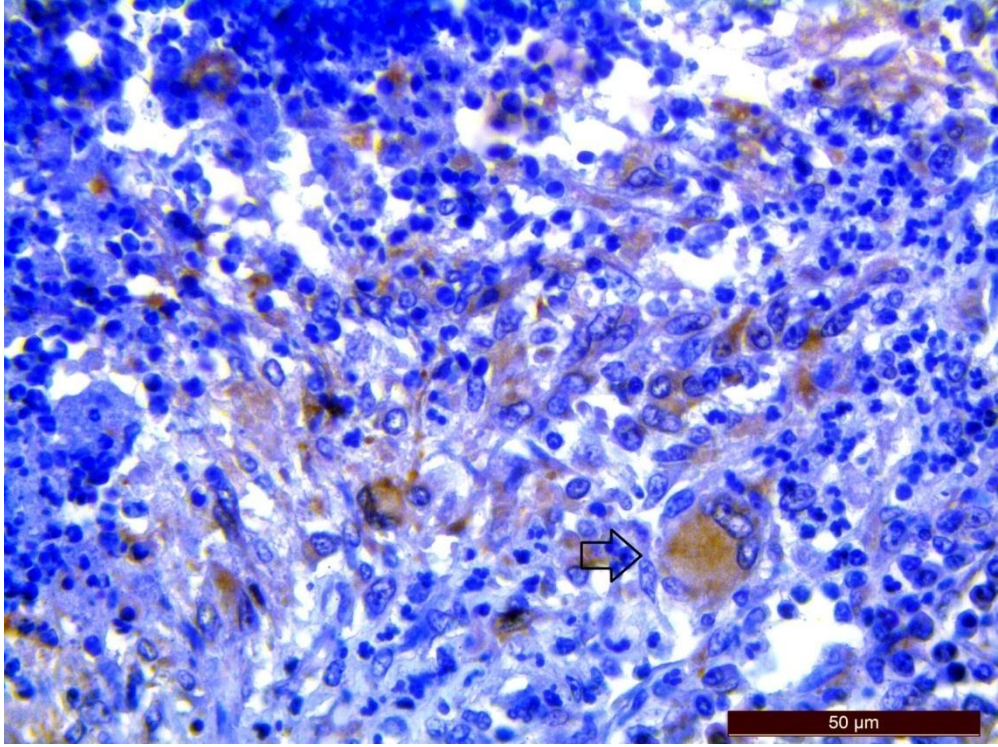
Şekil 29. Granülomdaki makrofajlar ve yabancı cisim dev hücrelerinde iNOS immunreaktivitesi (ok), bar: 20 μm , İmmunperoksidaz boyama.



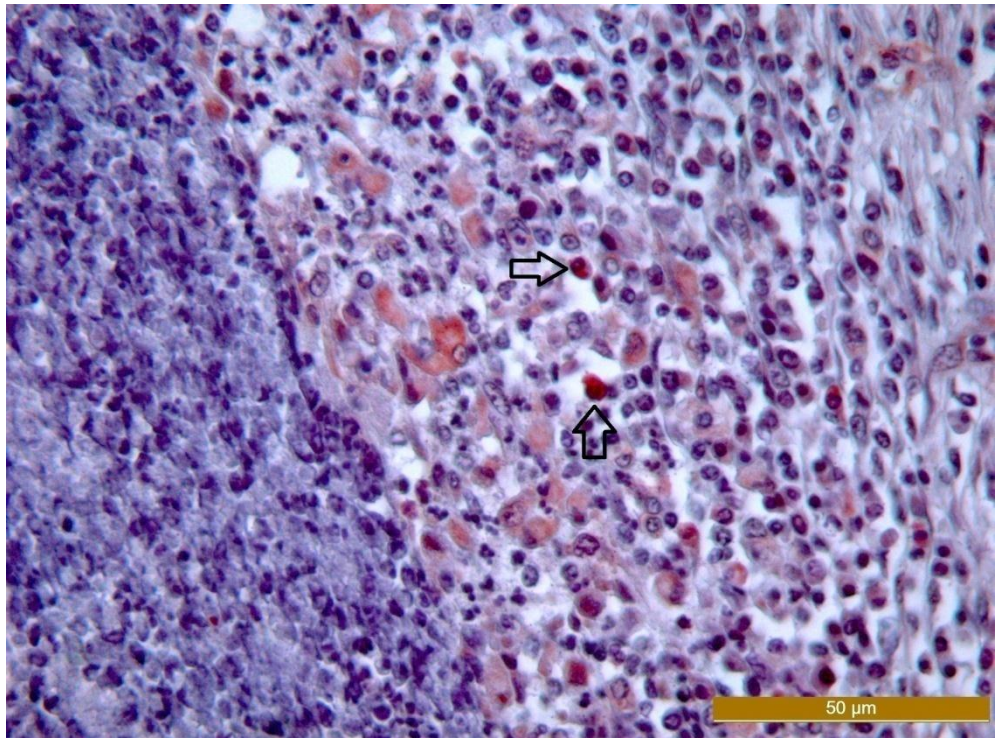
Şekil 30. iNOS immunpozitif makrofajlar ve yabancı cisim dev hücreleri (ok), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.



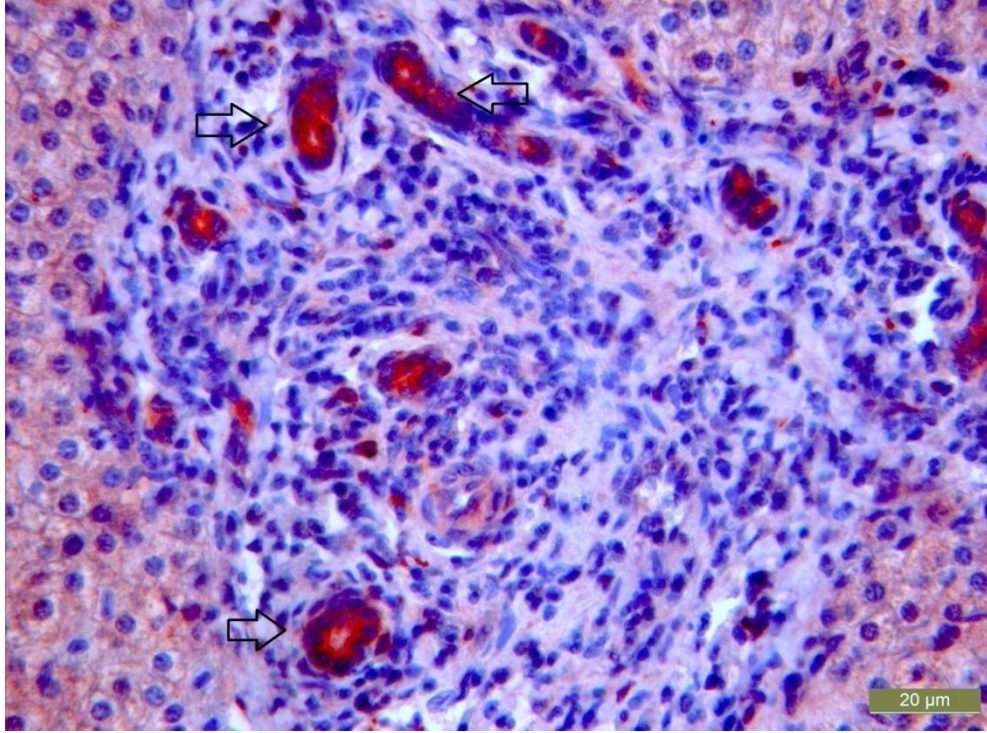
Şekil 31. Sitoplazmaları iNOS immunpozitif dev hücreleri (ok), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.



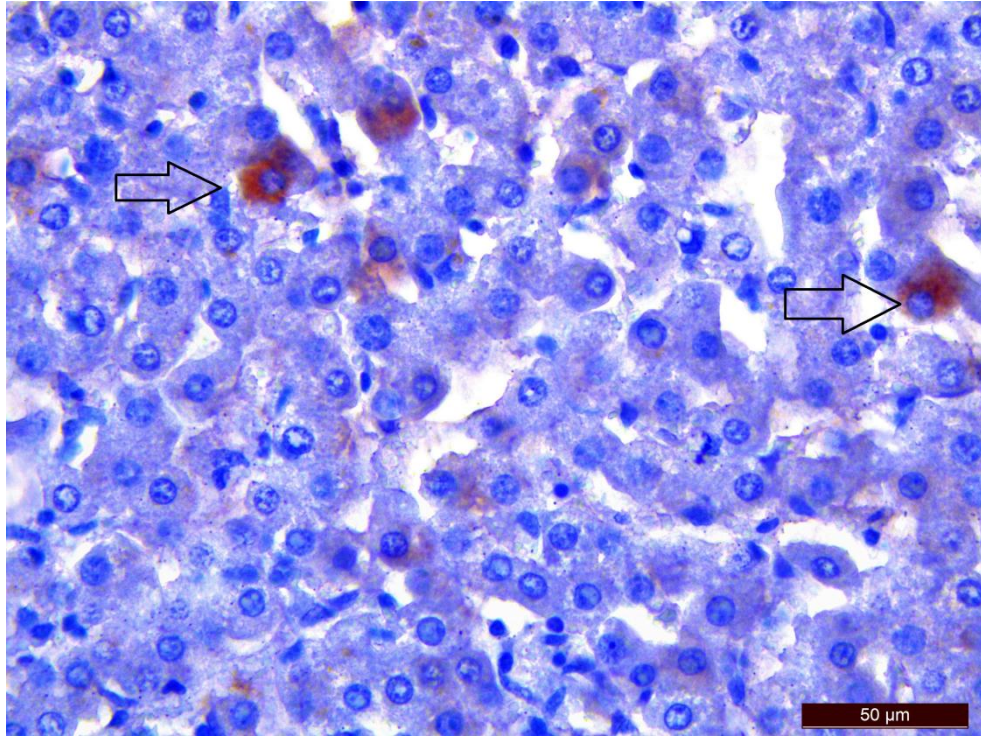
Şekil 32. iNOS immunpozitif yabancı cisim dev hücreleri (ok), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.



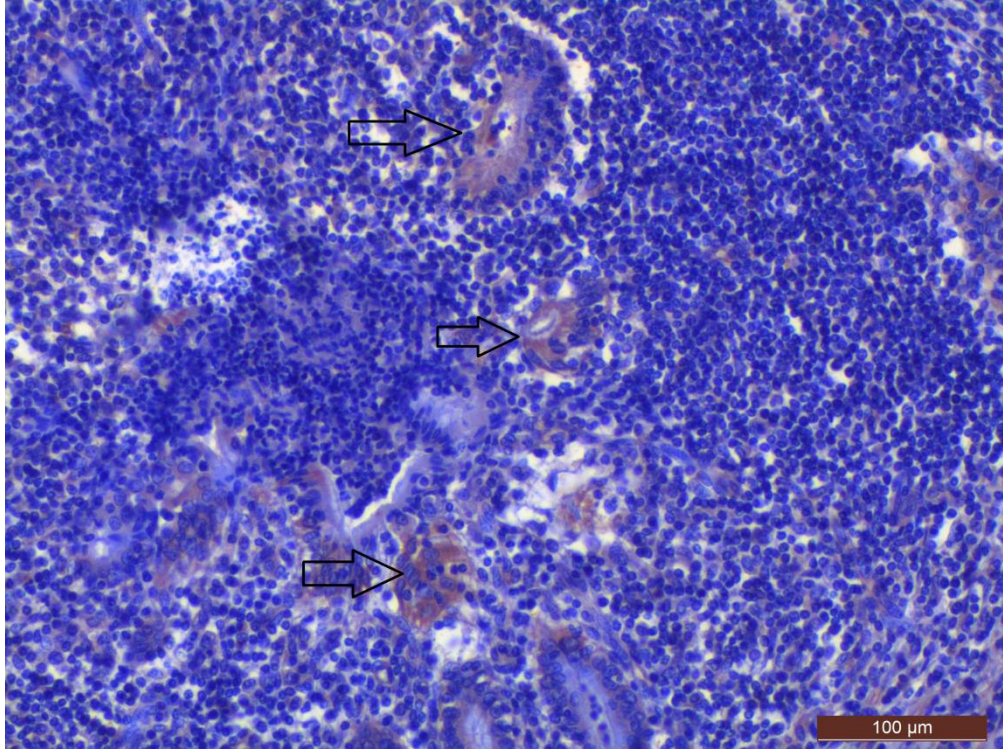
Şekil 33. iNOS immunpozitif makrofajlar (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.



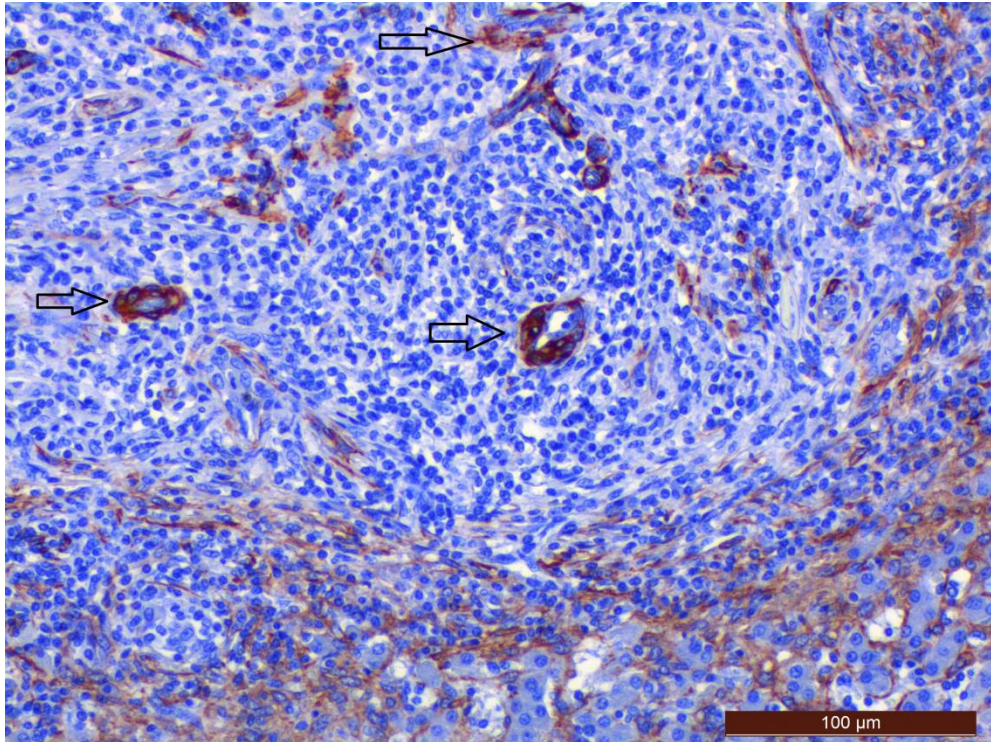
Şekil 34. Damar endotel hücrelerinde İNOS immunreaktivitesi (oklar), bar: 20 µm, İmmunperoksidaz boyama.



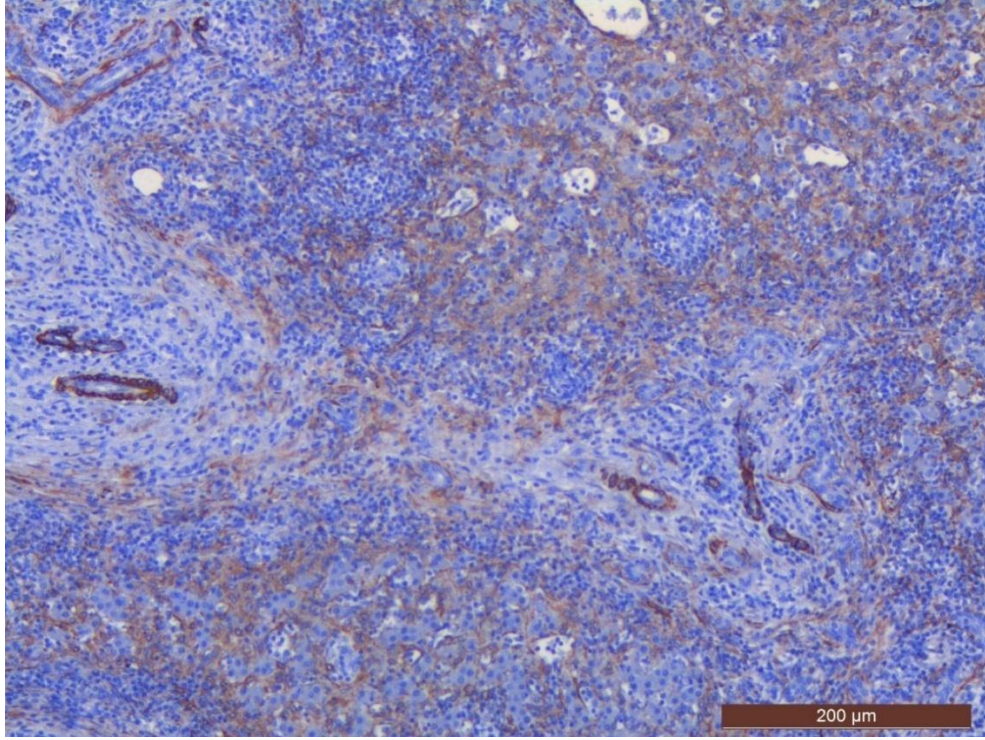
Şekil 35. p53 pozitif apoptotik hepatositler (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.



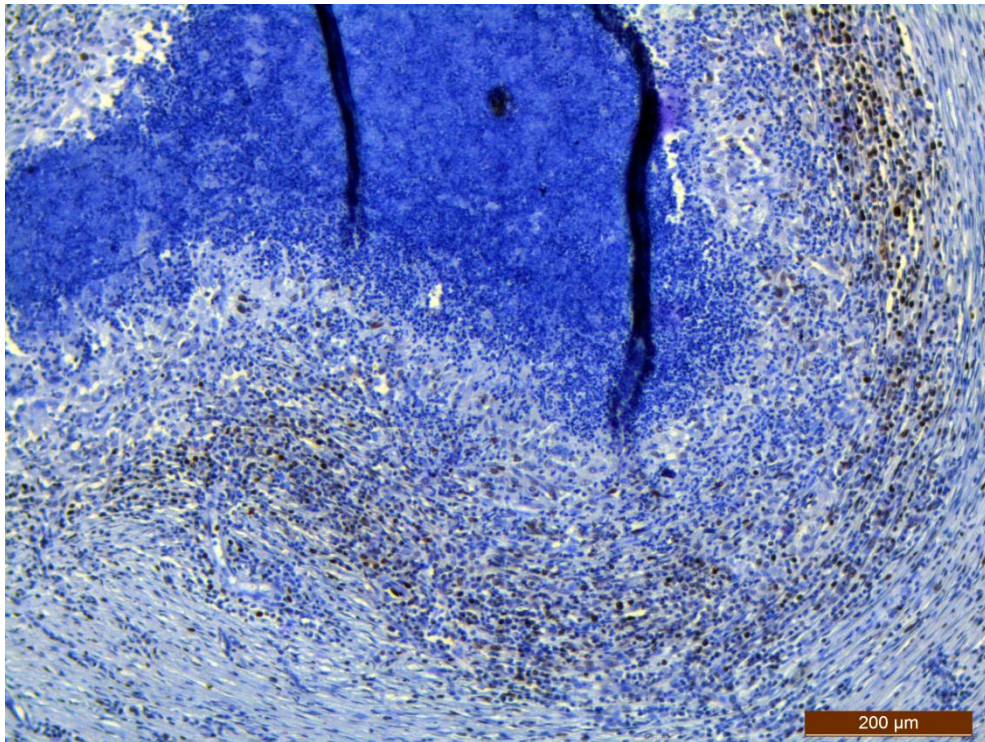
Şekil 36. Safra kanalı ve çevresinde oluşan granüloomda p53 immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.



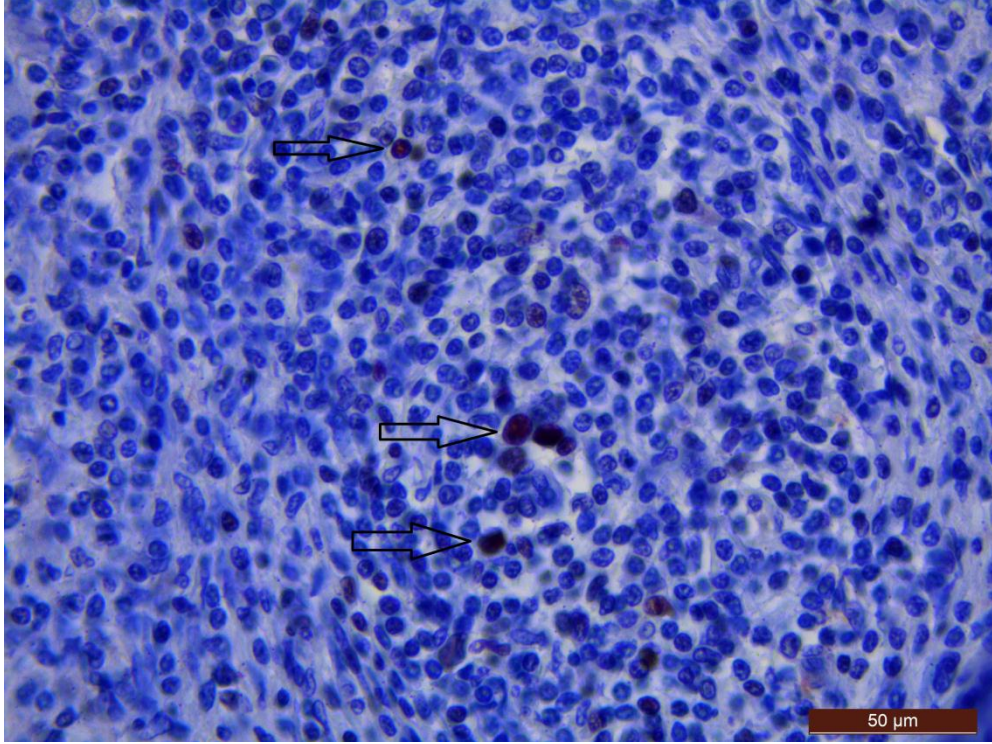
Şekil 37. Myofibroblastlarda ve damar düz kas hücrelerinde COX-2 immunreaktivitesi (oklar), bar: 100 µm, İmmunperoksidaz boyama.



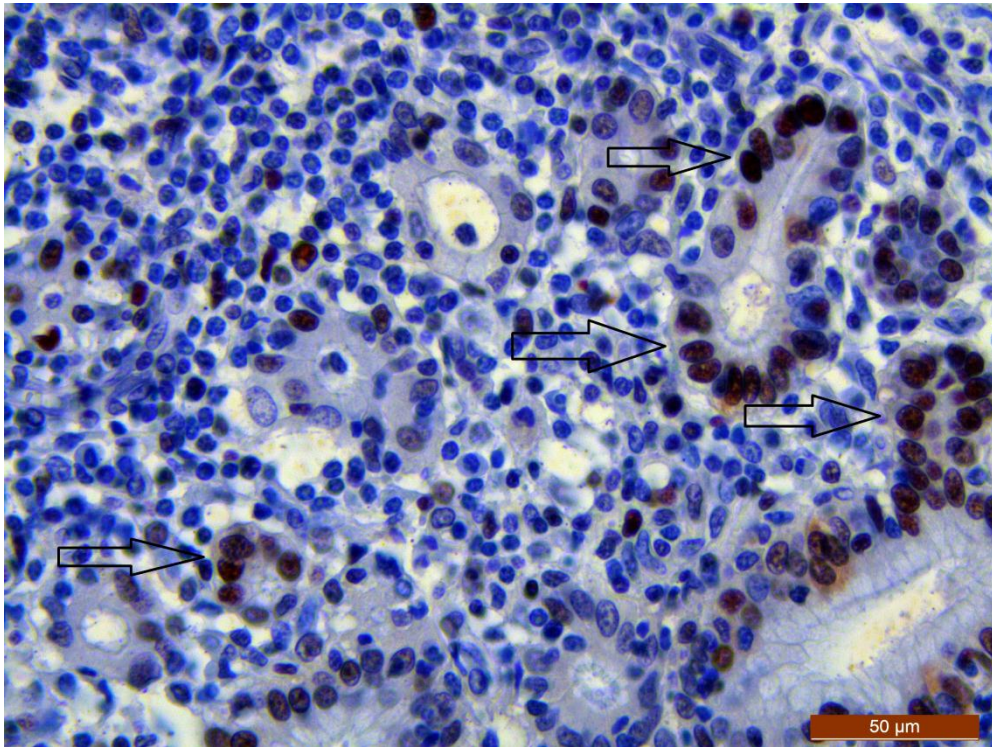
Şekil 38. Kuvvetli COX-2 immunreaktivitesi, bar: 200 µm, İmmunperoksidaz boyama.



Şekil 39. Granülom çevresinde PCNA pozitif lenfositler, bar: 200 µm, İmmunperoksidaz boyama.



Şekil 40. Lenfositlerde PCNA immunreaktivitesi (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.



Şekil 41. PCNA pozitif proliferen safra kanal epitel hücre çekirdekleri (oklar), bar: 50 µm, İmmunperoksidaz boyama.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer fibrozisi, ilerleyici karaciğer hasarının bir göstergesidir. Karaciğer hasarına yol açan bütün etkenler karaciğerde yangı ve nekrozla birlikte fibroze yol açarlar. Akut olaylarda geri dönüşümlü olan fibrozis, kronik zedelenme sürecinde rejenerasyon nodülleri ve fibröz bantların oluşumu ile portal hipertansiyon ve karaciğer fonksiyon bozukluğunun komplikasyonları ile seyreden siroza kadar ilerler (Bataller ve Brenner, 2005; Tucer, 2008). *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; Miman, 2007). Zoonoz olan fasioliazisin insan sağlığını önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (Moghadami ve Mardani, 2008; Markos ve ark., 2011; WHO, 2014). Karaciğer fibrozisi ve siroz ile ilgili çok sayıda deneysel çalışma yapılmış olmasına karşın, evcil hayvanlarda doğal enfeksiyonlarla ilgili sınırlı sayıda ayrıntılı patolojik ve immunhistokimyasal çalışma bulunmaktadır (Golbar ve ark., 2013). Makroskobik incelemede, daha önceki karaciğer fibrozisi çalışmaları (Şimşek ve ark., 2004; Balkaya ve ark., 2009; Balkaya ve ark., 2010; Mendes ve ark., 2012; Golbar ve ark., 2013) ile uyumlu olarak paraziter fibrozisli karaciğerlerin sert kıvamda ve soluk bir renkte olup, safra kesesi ve safra kanallarının dilate ve duvarlarının kalınlaştığı dikkati çekti. Bu dilate safra kanallarının bazısında erişkin parazitler gözlemlendi. Larva döneminde parankimde göç yapan parazitlerin erişkin dönemde safra kanalı ve safra kesesine yerleşmesinden dolayı parazitlerin yaptığı irkiltiye bağlı olarak şekillenen yangısal hücre infiltrasyonu ve artan bağ doku artışının safra kanalı duvarını kalınlaştırdığı ve karaciğerin daha sert bir yapıda olmasına sebep olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada, histopatolojik incelemede diğer daha önce yapılan bazı çalışmalarla uyumlu olarak hepatosit sitoplazmalarının şişkin eozinofilik olduğu, safra kanallarında proliferasyon, fibrozis, MNH infiltrasyonu (Perez ve ark., 1999; Şimşek ve ark., 2004; Balkaya ve ark., 2009; Balkaya ve ark., 2010; Beytut ve ark., 2011); yabancı cisim dev hücrelerinin bulunduğu granülomlar (Perez ve ark., 1999; Beytut ve ark., 2011; Mendes ve ark., 2012), bazı olgularda diffuz parankimal fibrozis ve rejeneratif lobüller (Golbar ve ark., 2013) ve hemosiderozis (Perez ve ark., 1999; Beytut ve ark., 2011) bulunduğu dikkati çekti. Perez ve ark (1999) eozinofil, makrofaj ve lenfositten

oluşan MNH infiltrasyonu ve proliferatif fibröz bağ dokunun çok yoğun olduğu odakların parazitlerin oluşturduğu eskimiş göç yolları olduğunu bildirmiştir. Organizasyon ile iyileşmede oluşan bu odaklara çalışmamızda da pekçok karaciğerde sıklıkla rastlandı. Mendes ve ark. (2012) ise granülomların, karaciğer paranziminde bulunan parazitin erişkin formu ve yumurtalarına bağlı şekillenebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada önceki literatürle (Mendes ve ark., 2012) uyumlu olarak bazı granülomların merkezinde parazit kesitleri gözlemlendi. Bu granülomların safra kanalına ulaşmamış erişkin parazitlere ait olabileceği ancak bunun dışında safra kanalı lumeninde bulunan parazit etkenlerinin granülomlara sebep olduğu gözlemlendi. Ayrıca Beytut ve ark. (2011) ile uyumlu olarak granülomlarda bulunan plazma hücrelerinde Russel cisimcikleri görüldü.

α -SMA, myofibroblastların farklılaşmasını ortaya koyan ve doku onarım sürecine katılan önemli bir proteindir. Aktive olan karaciğer stellat hücreleri karaciğer fibrozisinde önemli rol oynar. Çeşitli sitokinlerle aktive olarak myofibroblast benzeri hücrelere dönüşür. Bu hücreler fibröz kollajen içeren ekstrasellüler matriks sentezler ve α -SMA immunpozitifler. Bu aktivasyon yoğun α -SMA ekspresyonu ile kesin bir şekilde belirlenir. α -SMA ayrıca damar düz kas hücrelerinde de bulunur (Aram ve ark., 2008; Erdoğan, 2010; Golbar ve ark., 2013; Marinkoviç ve ark., 2013; Rocha ve ark., 2014). Baddamwar (2004)'ın, *Schistosoma japonicum* ile domuzlarda deneysel, Golbar ve ark. (2013) sığırlarda doğal fasioliyazis ile Marinkoviç ve ark. (2013) tarafından *Fasciola* spp. ile doğal enfekte alageyiklerin karaciğer fibrozisinde karaciğer stellat hücrelerinin, safra kanallarının epitel hücrelerinin ve granülomları saran fibroblast benzeri hücrelerin α -SMA pozitif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca portal alanda kan damarlarında arttığı ve bu damar düz kas hücrelerinde pozitif olduğunu 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 patolojik olgularda sentezlenen serbest bir radikaldir. Nitrik oksit üretimi yangısal cevabın bir parçasıdır, yara iyileşmesi ve fibroziste rol oynamaktadır. Paraziter infeksiyonlarında yaygın görülen bir bulgudur. Parazitin 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 sentezlenmektedir (Ahn ve ark., 1999; Lee ve ark., 2001; Aram ve ark., 2008; Anavi ve ark., 2015). Rottenberg ve ark., (1996) *Trypanosoma cruzi* infeksiyonlarında immunhistokimyasal olarak parazit yüzeyinde ve çevresindeki hücrelerle iNOS immunreaktivitesini göstermişlerdir. Carvalho ve ark., (2012) ise kronik olarak *T. cruzi* ile deneysel enfekte maymunlarda iNOSu çok yoğun olarak kalp kası hücrelerinde immunhistokimyasal yöntem ve PCR ile tespit etmişlerdir. Santos ve ark., (2011) viseral leishmaniozisli doğal enfekte köpeklerin dalağında iNOS immunreaktivitesi immunhistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Non enfekte kontrol grubuna göre enfekte köpeklerde iNOS miktarının önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Anavi ve ark., (2015) yüksek kolesterolün 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 hemde yara iyileşmesi ve karaciğer fibrozisinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada paraziter kaynaklı fibrozis değerlendirildiği için iNOS tüm olgularda pozitif bulundu.

Tümör baskılayıcı protein olarak bilinen p53, hücre döngüsü, DNA tamiri ve apoptozisin düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli genlerin transkripsiyon hızını düzenleyen bir faktördür. Hücre çekirdeğinde bulunan gen hasara maruz kaldığında bu proteinin sentezlenmesi sağlanmaktadır (Özbilim ve ark., 1997; Özdemir, 1998; Kapucuoğlu ve ark., 2001). Tousson ve ark., (2012) *Schistosoma mansoni* ile deneysel olarak enfekte fare karaciğer dokularını histopatolojik ve immunhistokimyasal (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.

COX-2; çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler tarafından uyarılarak yangısal süreçte görev alan makrofajlar, kondrositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinden sentezlenmektedir (Heitmeier ve ark., 2004; Nur ve ark., 2015). 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 immunflorasan, 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. 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.

ÖZET

AKGÜN A. Koyunlarda Paraziter Kaynaklı Karaciğer Fibrozisinde İmmunhistokimyasal İncelemeler, YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2015. Karaciğer fibrozisi ülkemizde ve dünyanın pekçok bölgesinde insan ve hayvan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu çalışmada makroskobik incelemede paraziter fibrozis bulguları gösteren 30 koyun karaciğer dokusu, histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak (α -SMA, iNOS COX-2, p53 ve PCNA) incelendi. Karaciğerler yoğun fibrozisten dolayı oldukça sert kıvamda ve soluk renkteydi. Safra kanalları dilate ve duvarları kalınlaşmıştı. Yüzeyi grimsi beyaz sert fibrotik odaklarla kaplı karaciğerlerin kesit yüzeyinde safra kanallarının içinde kahverengimsi müköz eksudat ve erişkin parazitler görüldü. Histopatolojik incelemede, hepatositler şişkin, sitoplazmaları eozinofilik ve granülerdi. Portal alanda lenfosit, makrofaj ve eozinofilden oluşan MNH infiltrasyonu ve fibrozis şekillenmişti. İçinde parazit bulunan safra kanalı epitellerinde hiperplazi ve çevresini saran değişen şiddette MNH infiltrasyonu ile fibrozis gözlemlendi. Merkezde vena sentralisleri bulunmayan rejenere hepatositlerin oluşturduğu nodüller (pseudolobulus) şekillenmişti. Ayrıca çok çekirdekli dev hücreleri ve MNH içeren fibröz doku ile sarılmış granülomlar görüldü. İmmunhistokimyasal incelemede; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fibrotik karaciğerlerde α -SMA, İNOS, COX-2, p53 ve PCNA için çok daha yüksek pozitiflik gözlemlendi. Fibrotik karaciğerlerde α -SMA proliferatif myofibroblastlar, iNOS makrofaj, dev hücreler ve damar endotel hücrelerinde, p53 hepatosit sitoplazması ile granülomlardaki dev hücrelerinde, COX-2 myofibroblastlar, damar düz kas hücreleri ve MNH infiltrasyonlarında, PCNA safra kanalı epitel hücresi, fibroblast ve hepatositlerin çekirdeğinde değişen şiddette immunpozitif boyanma gösterdi. 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 Sözcükler: Karaciğer paraziter fibrozis α -SMA, iNOS, COX-2, p53 ve PCNA.

SUMMARY

AKGUN A. Immunohistochemical Investigation in Sheep with Parasitary Liver Fibrosis, University of Yuzuncu Yil, Institute of Medical Sciences, Department of Pathology, Van 2015. Liver fibrosis significantly effect human and animal health in our country and worldwide. In this study, 30 sheep liver tissues with macroscopical parasitary fibrosis were examined histopathologically and immunohistochemically (α -SMA, iNOS COX-2, p53 and PCNA). Livers were excessively firm and pale due to intense fibrosis. Bile ducts were dilated and had thickened walls. Cross section of liver was covered with white firm fibrotic foci and brownish mucous exudate and adult parasites were observed in bile ducts. According to the histopathological examination; hepatocytes were swollen, eosinophilic and had granules. In portal region; mononuclear cell infiltration and fibrosis were formed containing lymphocytes, macrophages and eosinophils. In epithelium of bile ducts containing parasites, hyperplasia was present and mononuclear cell infiltration and fibrosis were observed at the surrounding bile ducts with variable severity. In the center, nodules (pseudolobulus) were formed by regenerated hepatocytes which did not have central veins. Besides, granulomes surrounded by fibrous tissue containing polynucleated giant cells and mononuclear cells were observed. According to immunohistochemical examination; stronger positivity was observed in SMA, iNOS, COX-2, p53 and PCNA compared to control group. Strong immunopositivity with variable severity for α -SMA was observed in prolipherated myofibroblasts ; for iNOS was observed in macrophages, giant cells and endothelium cells of vessels; for p53 was observed in hepatocyte cytoplasm and giant cells in granulomes; for COX-2 was observed in myofibroblasts, smooth muscle cells of vessels and in mononuclear cell infiltrations; for PCNA was observed in epithelial cells of bile ducts, fibroblasts and hepatocytes. It is concluded that, in fibrosis using α -SMA in order to present connective tissue increase; using COX-2 as fibrosis and cirrhosis are in the basis of liver tumors and COX-2 has a role in wound healing; using PCNA in order to evaluate increase proliferation, using p53 for apoptosis, using iNOS antibody as its secreted from macrophages were found beneficial.

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

KAYNAKLAR

Ahn B, Han BS, Kim DJ and Ohshima H (1999). Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by *N*-nitrosodiethylamine, *Carcinogenesis*, 20, 7, 1337-1344.

Anavi S, Eisenberg-Bord M, Hahn-Obercyger M, Genin O, Pines M and Tirosh O (2015). The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis, *Laboratory Investigation*, 95, 914-924.

Aram G, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS and Mezey E (2008). Lack of inducible nitric oxide synthase leads to increased hepatic apoptosis and decreased fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration, *Hepatology*, 47, 6, 2051-2058.

Aytuğ CN, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın BC, Gökçen H ve Türker H (1990). Koyun-Keçi Yetiştiriciliği ve Hastalıkları, Tüm Vet Hayvancılık Hizmetleri, Teknografik Matbaası, İstanbul.

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 ve Atasever İ (2010). *Fasciola hepatica* ile doğal enfekte sığır karaciğerlerinin morfolojik ve histopatolojik olarak incelenmesi, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 5, 1, 7-11.

Balkaya İ, Terim Kapakin Terim KA ve Küçükkalem ÖF (2009). *Dicrocoelium dendriticum* ile enfekte koyun karaciğerleri üzerinde parazitolojik ve patolojik incelemeler, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 4, 3, 169-175.

Bateller R ve Brenner DA (2005). Liver fibrosis, *Journal of Clinical Investigation*, 115, 209-218.

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 ve 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.

Carvalho CM, Silverio JC, da Silva AA, Pereira IR, Coelho JM, Britto CC, Moreira OC, Marchevsky RS, Xavier SS, Gazzinelli RT, da Glória Bonecini-Almeida M, Lannes-Vieira J (2012). Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected Rhesus monkeys: Association with heart injury. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, 5, 1-15.

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.

Erdođdu S (2010). Safra yolu bağlanmış sıçanlarda antitrombotik ajan dalteparinin hepatik fibrozis gelişimini önlemedeki rolü. Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Edirne.

Ergün Y ve Ergün Y (2009). Karaciğer sirozu ve nitrik oksit. Arřiv. 18, 91

Friedman SL (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 4, 2247-50.

Golbar HM, Izawa T, Juniantito V, Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M and 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.

Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Sage PB, Balabaud C and Desmouliere A (2006). Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved, *The Internation Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 135–51.

Gül Y, Akgül Y, Sonceley S ve Cansancak Y (1990). Van ili belediye mezbahasında kesilen keçi karaciğerlerinde trematodlara bağlı patolojik bulgular. *YYÜ. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 1, 76-87

Heitmeier MR, Kelly CB, Ensor NJ ve Gibson KA (2004): Role of cyclooxygenase-2 in cytokine-induced β -cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets, *JBC Papers in Press*, 279, 53145-53151.

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.

James JP, Lynda RT, Frank A and Esteban M (1999). A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells, *Wiley Online Library*, 19, 2, 135-144.

James SL (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections, *Microbiological Reviews*, 59, 4, 533-547.

Jones TC, Hunt RD and King NW (1997). *Veterinary Pathology*, 4. baskı, Williams & Wilkins, Inc., Baltimore, USA.

Jubb KVF, Kenneddy PC and Palmer N (1992). *Patology of Domestic Animals*. 4th edition. Academic Press. London, 284-288.

Kapucuoğlu N, Boduroğlu EC, Irkkan Ç ve Pak I (2001). Bazal hücreli karsinomda p53 protein ekspresyonunun immunhistokimyasal yöntemle saptanması, *Turkish Bulletin of Pathology*, 18, 1, 31-34.

Karahan S, Çavuşoğlu K, Atmaca HT ve Yalçın E (2008). Albino farelerde iyonlaştırıcı radyasyonun hepatosit morfolojisi ve proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA)

ekspresyonu üzerindeki etkileri, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5, 2, 61-66.

Karakaya D, Barış D ve Tür A (2000). Nitrik oksit, *OMÜ Tıp Dergisi*, 139-148.

Kayadibi H ve Sertoğlu E (2014). Non-invasive indirect biochemical markers for liver fibrosis, *Archives Medical Review Journal*, 23, 3, 427-442.

Khanjari A, Bahonar A, Fallah S, Bagheri M, Alizadeh A, Fallah M and KhanjariZ (2014). Prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis in slaughtered sheep and goats in Amol Abattoir, Mazandaran, northern Iran, *Asian Pasific Journal Of Tropical Disease*, 4, 2, 120-124.

Kır C, Dilek FH ve Aktepe F (2006). Proliferatif fasiitis: bir olgu sunumu, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 6, 67-69.

Kömürcü Y (2011). Safra yolları bağlanmış sıçanlarda hepatik fibrozis gelişiminin önlenmesinde pravastatin tedavisinin etkinliği. Tekirdağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Astes JS (2014). Robbins and cotran pathological basis of disease, *Philadelphia US: Elsevier Saunders*, 877-927.

Lee VG, Johnson ML, Baust J, Laubach WSC and Billiar TR (2001). The roles of iNOS in liver ischemia-reperfusion injury, *Shock*, 16, 5, 355-360.

Marcos LA, Terashima A, Yi P, Andrade R, Cubero FJ, Albanis E, Gotuzzo E, Espinoza JR and Friedman SL (2011). Mechanisms of liver fibrosis associated with experimental *Fasciola hepatica* infection: roles of fas2 proteinase and hepatic stellate cell action, *Journal of Parasitology*, 97, 1, 82-87

Marinković D, Kukulj V, Aleksić-Kovačević S, Jovanović M and 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*, 9, 45.

Mas-Coma S, Bargues MD and Valero MA (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses, *International Journal for Parasitology*, 35, 1255-1278.

McManus DP and Dalton JP (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*, *Parasitology*, 133, 43-61.

Mendes EA, Vasconcelos AC and Lima WS (2012). Histopathology of *Fasciola hepatica* infection in *Meriones unguiculatus*, *Revista de Patologia Tropical*, 41, 1, 55-62.

Mendes RE, Pérez-Ecija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno A, Dalton JP, Mulcahy G and Pérez J (2010). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*, *Vaccine*, 28, 2832-2840.

Mıman Ö (2007). Kistik Ekinokokkozis olgularının irdelenmesi ve histopatolojik incelemede nekrozun tanısal önemi. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya

Moghadami M and Mardani M (2008). *Fasciola hepatica*: A cause of obstructive jaundice in an Elderly Man from Iran, *Saudi Journal Gastroenterol*, 14, 4, 208–210.

Nur G, Yıldız S E, Nazlı M ve Sönmez M (2015). Puberte döneminde capsaicin uygulanan sıçanların karaciğerinde COX-1 ve COX-2'nin immunohistokimyasal lokalizasyonu, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 62, 45-50.

Oruç E (2009). Mezbahada kesilen sığırlarda karaciğer lezyonları üzerine histopatolojik bir çalışma, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 4, 2, 97-104.

Özbiçim G, Özkal-Üstün M, Karpuzoğlu G, Sargın F and Sarper A (1997). Mezotelyomalarda immunohistokimyasal olarak p53 değeri, *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 5, 122-125.

Özdemir E (1998). Ürotelyal karsinogenezis araştırılmasında p53 anahtarı, *Türk Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 18, 277-284.

Özdil B (2008). Kronik heatit ve sirozlu vakalarda Cox-2 gen polimorfizminin fibrozis gelişimindeki önemi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Adana.

Qi LN, Bai T, Chen ZS, Wu FX, Chen YY, De Xiang B, Peng T, Han ZG and Li LQ (2014). The p53 mutationspectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China: role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure, *Liver Internation*, 35, 3, 999-1009.

Pe´rez J, Mulas JM, Carrasco L, Gutierrez PN, Martı´nez-CruzMS and Moreno AM (1999). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*, *Journal of Comparative Pathology*, 120, 199–210.

Radfar MH, Zarandi MB, Bamorovat M, Kheirandish R and Sharifi I (2014). Hematological, biochemical and pathological findings in goats naturally infection with *Cysticercus tenuicollis*, *Journal Parasitic Diseases*, 38, 1, 68-72.

Rocha SWS, França M, Rodrigues GB, Barbosa KPS, Nunes AKS, Pastor AF, Oleveria AGV, Oleveria WH, Luna RLA and Peixoto CA (2014). Diethylcarbamazine reduces chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride-(CCl 4-) Induced Liver Injury in Mice, *Mediators of Inflammation*, 696383, 15.

Rockey DC ve Friedman SL (2007). Hepatic fibrosis and cirrhosis, *New York*, 87-109.

Rottenberg M, Castaños-Velez E, Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P and Orn A (1996). Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): 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 and 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.

Seydel GŞ (2011). Hepatosellüler karsinomaya neden olan genlerin gen ekspresyonunun kantitatif ölçümü. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Doktora tezi, Adana.

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 ve Ütük A (2004). *Dicrocoelium dendriticum*'un koyun karaciğerinde yaptığı tahribatın morfolojik ve histopatolojik olarak incelenmesi, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28, 4, 189-191.

Taylor CR ve Cote RJ (1994). Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist, *Saunders Company*, 214-222.

Temel S ve Gökçimen A (2002). Karaciğer yıldızsı hücreleri (Ito Hücreleri), *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22, 342-348

Tınar R, Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Ayaz E ve Şenlik A (2011). Veteriner Helmitoloji, Dora Basım Yayım Dağıtım, Bursa.

Tousson E, Beltagy DM, Gazia MA and Al-Behbehani B (2012). Expressions of p53 and CD68 in mouse liver with *Schistosoma mansoni* infection and the protective role of silymarin, *Toxicology and Industrial Health*, 29, 8, 761-770.

Tucer D (2008). Kronik viral hepatitisi hastalarda noninvaziv serum belirteçlerinin karaciğer fibrozis derecelerini belirlemedeki rolleri. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Yandal Uzmanlık Tezi, Edirne.

Türköz Y ve Özerol E (1997). Nitrik oksitin etkileri ve patolojik rolleri, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 4, 453-461.

Uluoğlu Ö (1990). Patoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 735-79.

Wang X, Tang X, Gong, Albanis E, FriemanSL, Mao Z (2004) Regulation of hepatic stellate cell activation and growth bytranscription factor myocyte enhancer factor 2, *Gastroenterology*, 127, 4, 1174-1188.

WHO (2014). Foodborne trematode infections. Eriřim Tarihi: 28. 07. 2015
http://www.who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/en/

Wynn TA and Barron L (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin. Liver Diseases*, 30, 245–257.

Yıldırım A, İa A, Beyaz L ve Atasaver A (2006). Bir kuzuda akut hepatitis cysticercosa ve pneumonitis cysticercosa: Olgu Sunumu, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 30, 2, 108-111.

ÖZGEÇMİŞ

Ayhan AKGÜN 02.12.1987'de Iğdır ilinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Iğdır'da bitirdi. Üniversiteye 2006-2007'de Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi'nde başladı. 2011-2012'de Lisans ve Yüksek lisans mezunu olmaya hak kazandı. 2012-2013 yılında Güz Dönemi'nde Y.Y.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 10.02.2013 tarihinde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Erciş Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak atandı ve halen devam etmektedir.