

T. C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**VİRAL HEPATİTLERDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN VE
İNHİBİTÖRLERİNİN EKSPRESYON PATERNLERİ
VE FİBROZİS İLE İLİŞKİSİ**

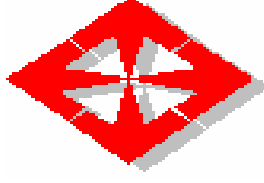
UZMANLIK TEZİ

Dr. F. Pınar UYAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu BİLEZİKÇİ

ANKARA – 2005



T. C.

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**VİRAL HEPATİTLERDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN VE
İNHİBİTÖRLERİNİN EKSPRESYON PATERNLERİ
VE FİBROZİS İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. F. Pınar UYAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu BİLEZİKÇİ

ANKARA – 2005

Patoloji, ucu bucağı belli olmayan bir okyanus gibidir. Derinliklerine indikçe renkli ancak bir o kadar da tehlikeli olduğunu anlarsınız. Kaybolmamak ve yanlış yapmamak için, işini çok iyi bilen rehberlere ihtiyacınız vardır.

İşte 3 yıl önce başlayan bu renkli, zevkli ve tehlikeli yolculuğumda bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden, ilgi ve şefkatleriyle ikinci bir aile sıcaklığını yaşatan kıymetli hocalarım:

Prof. Dr. Yücel Güngen,
Prof. Dr. Beyhan Demirhan,
Prof. Dr. Bülent Celasun,
Doç. Dr. Banu Bilezikçi,
Doç. Dr. Handan Özdemir,
Yrd. Doç. Dr. Ünser Arıkan,
Uzm. Dr. Özlem Özen,
Uzm. Dr. Nihan Haberal,
Uzm. Dr. Hakan Aydın' a

Destekleri ile tez çalışmamı kolaylaştıran Doç. Dr. Banu Bilezikçi, Uzm. Dr. Özlem Özen ve Prof. Dr. Beyhan Demirhan' a,

Yardımları ve güler yüzleri ile, birlikte çalışmaktan keyif duyduğum tüm mesai arkadaşlarıma ,

Her zaman yanımda olan aileme ve tüm dostlarıma

TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Pınar UYAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I-	GİRİŞ VE AMAÇ	1 - 3
II-	GENEL BİLGİLER	4 – 24
	A- Kronik Viral Hepatit	4 – 14
	B- Fibrozis	14 – 17
	C- Matriks Metalloproteinazlar ve İnhibitörleri	7 – 24
III-	GEREÇ VE YÖNTEM	25 – 28
IV-	BULGULAR	29 – 40
V-	TARTIŞMA	41 – 42
VI-	ÖZET	43 – 44
VII-	KAYNAKLAR	45 – 54

I. GİRİŞ

Kronik hepatitlerde prognoz açısından fibrozis ve bunu takiben siroz gelişimi önemlidir. Bu nedenle de fibroproliferatif aktivitenin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Fibrozisin değerlendirilmesinde karaciğer biyopsisi halen altın standart iken, pek çok araştırmacı bu sürecin değerlendirilmesinde kullanılabilen invaziv olmayan testler bulma yönünde çalışmalar yapmaktadırlar¹⁻⁷.

Karaciğerde fibrozis, matriks sentezi ve bağ dokusu proteinlerinin yıkımı arasındaki dengenin, ekstraselüler matriksin artması yönünde bozulması sonucu gelişir. Birçok biyokimyasal ajan, fibroblastik proliferasyonu gösteren, potansiyel invaziv olmayan serum / plazma belirleyicileri olarak ele alınmıştır. Bunların arasında matriks metalloproteinazlar (MMP) ve doku inhibitörlerinin, siroz gelişimi ile yakından ilişkili olabilecekleri öne sürülmüştür¹⁻⁷. MMP ailesi, ekstraselüler matriks makromoleküllerini yıkan, birbirleriyle yapısal olarak ilişkili enzimlerden oluşmaktadır⁸. MMP aktivitesinin; yara iyileşmesi, ovulasyon, blastokist implantasyonu, kemik gelişimi ve anjiogenez gibi çeşitli fizyolojik olaylarda önemli rol oynadığı bilinmektedir⁹. MMP'lerin kontrolü; gen transkripsiyonu, inaktif zimojenlerin aktivasyonu ve metalloproteinazların doku inhibitörleri (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases: TIMP) tarafından inhibisyonu gibi basamaklar içermektedir⁸. MMP ve TIMP arasındaki dengenin bozulması, başta beyin tümörleri olmak üzere pek çok tümöral olayda invazyon mekanizmasına katkıda bulunabilir¹⁰⁻¹⁵. Bu konuda yapılan çok sayıda çalışma ile, neoplastik

hücre invazyonu ve metastaz olaylarında önemli bir role sahip oldukları saptanmıştır¹⁶. Bu grup içerisinde jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9), tip IV kollajeni yıkabilme özellikleri nedeniyle fibrozis gelişim mekanizmasında önemlidirler⁸.

Karaciğer hastalarında periferik kanda MMP ve TIMP'ların dolaşımdaki konsantrasyonlarının ölçüldüğü, birbirleriyle çelişen sonuçlar elde edilen pekçok çalışma yapılmıştır¹⁻⁷, ancak dolaşımdaki MMP ve TIMP'ların hücresel kaynağı hakkında çok az bilgi mevcuttur. Günümüzde kronik hepatit ve sirozlu hastaların dolaşımlarında çeşitli MMP ve TIMP seviyelerinin artmış olduğu kanıtlanmış olmakla birlikte, fibrozis derecesi ile ilişkisi tam olarak anlaşılammıştır. Karaciğer dokusunda ekspresyonları ise çok az sayıda çalışmada RT-PCR/ELISA ve in situ hibridizasyon yöntemleri ile araştırılmış olup¹⁷⁻¹⁹, ekspresyon paternlerinin ve dolaşımdaki MMP ve TIMP'ların gerçekte karaciğerde hangi hücrelerden köken aldığını gösterecek kapsamlı bir immunhistokimyasal çalışma yoktur. Ayrıca bazı MMP'ların dolaşımda olmaksızın dokuda eksprese edildikleri göz önüne alındığında, matriks metalloproteinaz ve doku inhibitörlerinin ekspresyon paterninin, kronik hepatitlerde ve sirozda histopatolojik bulgularla korelasyon gösterebileceği düşünülmüştür².

AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, kronik viral hepatitli hastaların karaciğer biyopsilerinde çalışılacak olan MMP ve TIMP'in immünohistokimyasal olarak saptanacak ekspresyon paternlerinin, viral hepatitin grade ve evresi ile ilişkisini araştırmaktır. Bu bulgular ışığında, gelecekte MMP' ler ve TIMP' lerin, kronik hepatit tanı ve tedavisinde ek bir yöntem olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktır.

I- GENEL BİLGİLER

A. KRONİK VİRAL HEPATİT

Hepatit karaciğerin inflamasyonudur. Viral hepatitler genellikle neden olan virüsün tipine göre sınıflandırılırlar (Tablo 1), ancak neden bilinmediğinde, klinik parametrelere bakılarak, klinikopatolojik sendromun paternine göre de sınıflandırılabilirler²⁰.

Tablo: 1 İnsanda hepatotropik hepatit virüsleri

Virüs	Tip	Hastalık
Hepatit A (HAV)	RNA; hepatovirüs	Sporadik/epidemik; Sadece akut. Fekal oral bulaş
Hepatit B (HBV)	DNA; hepadnovirüs	Akut / kronik , hepatoselüler karsinom (HCC). Parenteral bulaş
Hepatit C (HCV)	RNA; flavi- ve pestivirüs-benzeri	Akut, sıklıkla kronik , HCC. Parenteral bulaş
Hepatit D (HDV)	RNA, defektif virüs	Patojenite için HBV' ye ihtiyacı var. Hepatit B' yi şiddetlendirir
Hepatit E (HEV)	RNA virüs	Sporadik/epidemik. Sadece akut. Fekal-oral bulaş
Diğerleri	RNA; Flaviviridae Paramiksovirüs Toga-virüs TT-virüs Parvovirüs B-19	HBV ve HCV ile sıklıkla birlikte Agresif hepatitle birliktelik bildirilmiş Fulminan hepatite dahil edilir Fulminan veya transfüzyon sonrası hepatite dahil edilir Çocuklarda aplastik anemi ile birliktelik gösteren fulminan hepatite dahil edilir

Hepatit virüsleri biyolojik ilişkilerinden dolayı değil, hepatotropik, yani başlıca etkileri karaciğer üzerine olduğundan birlikte gruplandırılmışlardır (Tablo 1). Sitomegalovirüs (CMV) ve Epstein-Barr virüs (EBV) de karaciğer lezyonları oluştururlar, ancak bu lezyonlar genellikle sistemik enfeksiyonun bir parçasıdır ve karaciğer, etkilenen birkaç organ veya sistemden bir tanesidir²⁰.

Kronik viral hepatit, hepatit B, C ve D virüslerinden en az bir tanesi ile ilişkili biyokimyasal, klinik ve histolojik bulgular paterni olarak tanımlanmaktadır. Klinik progresyon olasılığı ve oranları farklılık gösterse de üst üste örtüşen hasar mekanizmaları vardır ve karaciğerin bunlara verdiği cevap mekanizmaları benzerdir²¹.

Kronik hepatitin klinik tanımı; hepatotropik viral enfeksiyon zemininde, 6 ay veya daha uzun zamandır klinik semptomlar ve / veya biyokimyasal anormallikler ile kendini gösteren, sürekli, inatçı karaciğer inflamasyonudur²².

Kronik viral hepatitli hastalar asemptomatik olabileceği gibi semptomatik de olabilirler. Semptomlar: sürekli veya aralıklı halsizlik veya sarılık, hafif sağ üst kadranda ağrısı veya hassasiyeti, iştah kaybı, bulantı, güçsüzlük veya kas ve eklem ağrılarıdır. Semptomlar yoksa veya spesifik değilse, hastalar rutin fizik muayene esnasında veya başka bir nedenden dolayı sağlık kontrolüne geldiklerinde, tesadüfen saptanan biyokimyasal anormallikler sonucunda kronik viral hepatit oldukları anlaşılır. Biyokimyasal anormallikler: serum aminotransferazlarında artış ile serum alkalin fosfatazında orta dereceli bir artıştır²¹.

Kronik hepatiti düşündüren sendromu olan hastalarda serolojik çalışma yapılarak, olası bir viral enfeksiyon etkeni araştırılır²⁰.

Bazı hastalar kontrollerden kaçır, o zaman bu hastalığın geç evrelerinde, gelişmekte olan veya gelişmiş siroz semptomları kendini gösterir. Bu semptomlar herhangi bir nedenden dolayı gelişmiş son dönem karaciğer hastalığının semptomları gibidir: aşırı halsizlik veya sarılık, anoreksi, kilo kaybı, asit, gastrointestinal kanama ve ensefalopati. Hastaların küçük bir yüzdesinde ekstrahepatik tutulum veya sendromlar olabilir; böbrek, romatolojik veya kutanöz bulgular olabilir²¹.

Patolojik bulgular:

Kronik viral hepatit inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatosit ölümü, atrofi, rejenerasyon ve fibrozisin karışımı ile karakterizedir. Bu komponentler bir dereceye kadar akut viral hepatitte de vardır, ancak kronik viral enfeksiyonda relatif oranları ve dağılımları farklıdır. Oran ve dağılım viral enfeksiyonlar arasında farklılıklar gösterebileceği gibi aynı enfeksiyonu olan aynı hastada zaman içinde de farklılıklar gösterebilir²⁰.

Makroskopik görünüm:

Otopside veya tümör için yapılan parsiyel hepatektomilerde görüldüğü kadarıyla; kronik viral hepatitte karaciğer normal olabilir, fokal alanlarda fibrozis varsa kesit yüzü kumlu gibi görünebilir ya da fokal fibröz septa ve lokal rejenerasyona bağlı diffüz veya fokal lobule olabilir. Erken dönemde karaciğerin rengi normal olabilir çünkü hastalar nadiren kolestatiktir²⁰.

Siroz geliştikçe diffüz nodülerite ve fibröz skarlaşma meydana gelir. Klasik olarak kronik viral hepatite bağlı gelişen siroz makronodüler veya karışık mikro / makronodülerdir. Ancak bazen diffüz mikronodüler de olabilir. Nodüllerin rengi değişkendir. Et kırmızısı, kolestaz varsa koyu yeşil, yağlı değişiklik varsa sarı olabilir²³.

Iřık Mikroskopi Görüntüleri: nekroz, fibrozis ve inflamasyon

Kronik hepatitte inflamasyon ve hepatosit ölümlü genellikle aktiviteyi göstermektedir. İnflamatuvar hücrelerin dağılımı olgudan olguya, hatta aynı hastanın ardışık biyopsilerinde farklı olabilir. Hemen tüm olgularda portal alanlarda yoğun mononükleer infiltrasyon mevcuttur. İnflamasyon portal alanda sınırlıysa, en fazla "limiting plate" de minimal bozulma varsa, lobulde inflamasyon veya hepatosit ölümlü yoksa, o zaman hepatit inaktiftir. Bu patern Uluslararası Çalışma Grubu' nun orijinal sınıflandırmasına göre kronik persistan hepatittir²⁴. "Limiting plate" ve lobuler hepatositlerde inflamasyon ve apoptoz belli ise aktif hepatit (kronik aktif hepatit tabiri artık kullanılmamaktadır) denir²⁰.

Portal inflamasyon:

Hangi nedenle olursa olsun kronik hepatiti tanımlayan lezyon portal inflamasyondur. Portal alanların hepsi veya bir kısmı tutulmuştur ve akut viral hepatitten daha yoğun bir infiltrat mevcuttur. Portal alanlar normal veya genişlemiş olabilir. İnflamasyonda CD 4 + helper T–lenfositler baskın olup plazma hücreleri ile karışiktır²⁰. Bazı makrofajlar, ölü hepatosit

alanlarından nekrotik debriyi ortadan kaldırmalarına bağlı olarak periyodik asit-shiff (PAS) pozitif, diastaz rezistan materyal ve demir pigmenti içerirler²⁰.

Portal inflamasyon sıklıkla portal fibröz stromayı doldurur ve genişletir. Bu nedenle, özellikle de Hepatit C' de safra duktuslarında hasar ve yıkım olabilir²⁵⁻²⁹ (Resim 5, 7). İnflamasyon portal kan damarlarını, özellikle de portal ven dallarını etkileyerek, taze veya organize trombüslere neden olur³⁰.

“İnterface” Hepatit:

Portal alanın mezenkimal stroması ile karaciğer parankiminin birleştiği alan “İnterface” bölge olup bu alandaki inflamasyon ve hepatosit nekrozu sıklıkla “İnterface” hepatit olarak isimlendirilir. Bu lezyonun eski ismi “piece meal” (güve yeniği) nekrozdur³¹ (Resim 8, 9, 10).

“İnterface” hepatit bölgelerinde mononükleer infiltrasyon baskın olup çoğunluğu CD 8 + supresor / sitotoksik T hücreleridir. Hepatositler bu lenfosit, makrofaj ve plazma hücreleri ile yakın ilişki içindedir³²⁻³⁴. Hepatositlerin içinde lenfositlerin bulunması “emperipoesis” olarak tanımlanmıştır³⁴. “İnterface” hepatit alanında ölü veya ölmekte olan hepatositler de görülür. Bu hücrelerde apoptozun tipik bulguları: nükleer hiperkromazi ve parçalanma, sitoplazmada eozinofili ve parçalanma, komşu hücrelerden yuvarlak hücre yüzeyi ile ayrılma görülür^{20,32}.

Lobuler hepatit ve konfluent nekroz

Kronik viral hepatitteki bir diğerk aktivite formu da hepatik lobülün içinde, portal alanlardan ve septal skarlardan uzakta görülür. Böyle lezyonlara lobuler hepatit denilebilir. Eskiden bu lezyonlara kronik lobuler hepatit denmekteydi. Bu lezyonlar için sıklıkla kullanılan bir diğerk terim ise “spotty nekroz” dur (Resim 11). Aktivite olan alanlardaki inflamatuvar infiltrat “interface” hepatittekiler ile aynıdır, ancak bunun skar gelişmesinde ve kronik viral hepatite ilerlemedeki önemi bilinmemektedir²⁰.

Lobuler hepatitin bazı odaklarında mononükleer hücreler yoktur. Bu alanlarda nadir veya çok sayıda asidofil cisimcikler, PAS pozitif, diastaz rezistan materyal içeren makrofajlar veya aselüler debri ve gevşek kollajen ve retikülin demetleri bulunur. Eğer geniş alanlar tutulduysa lezyona konfluent nekroz denir. Eğer bu alanlar santral venden santral vene veya santral venden portal alana uzanıyorsa köprüleşme nekrozu terimi kullanılır. Köprüleşme nekrozu, skarlaşma ve siroza ilerleme olduğunun en kötü habercisidir³⁵⁻³⁹. Bazı vakalarda bir veya daha fazla lobülün tamamı harap olmuşsa panlobuler veya multilobuler kollaps denir. Bu alanlarda portal alanlar anormal derecede yakın görülür, arada sadece nekrotik debri, makrofajlar, gevşek veya daha matür kollajen ve elastin demetleri ile dolu bölgeler ile ayrılırlar. Duktular reaksiyon, bazı araştırmacılara göre hepatik kök hücre aktivasyonu da mevcuttur²⁰.

Fibrozis ve hepatosit rejenerasyonu

Kronik viral hepatit hastalarının bir kısmı fibröz skarlaşma göstermezken çoğunda bir miktar vardır. Artan fibrozis, hastalığın evresinin ilerlediğini gösterir. Skarlaşma genellikle portal stromanın genişlemesi ile olurken perivenüler ve periselüler fibrozis de görülebilir. Perivenüler fibrozis genellikle konfluent veya köprüleşme nekrozu alanındaki parankimin retikülin ağının kollapsı ve kondensasyonunu takiben meydana gelir. Oluşan skar ince ve genellikle aselülerdir ve eşlik eden yaygın “interface” hepatit yoktur. Bu septumlar bazen santral venlerle komşu portal alanları veya diğer hepatik venleri birleştirir ve bu vakalarda köprüleşme nekrozunun iyileşme alanını temsil eder (Resim 12, 13). Bu skarlar sürekli kalırsa, matür kollajen ve artan miktarlarda elastin demetler birikir ve bunlar orsein veya Victoria mavisi boyaları ile gösterilirler. Elastin demetlerinin birikimi skarın yaşının ilerlediğini gösterir⁴⁰.

Portal alanın genişlemesi olasılıkla daha aktif bir hasarlanma ve tamir sürecinin sonucunda olur. Portal fibrozis veya periportal fibrozis portal alandaki fibröz stromanın normal sınırlarını aşarak genişlemesidir. Fibrozis bir portal alan ile diğerini birleştirir. Bu septumlarda genellikle mononükleer iltihabi hücreler mevcuttur. Hepatitin aktivitesine göre fibrozis alanları “interface” hepatit ile birleşir. Fibrozis genellikle matürdür, trikrom boyaları ile koyu boyanır ve tip III kollajene ek olarak tip I kollajen ve retikülin demetler de içerir²². Elastin demetler kolaylıkla gösterilebilir ve bunlar

skarın en az birkaç aydır var olduğunu gösterir. İmmünohistokimyasal yöntemle düz kas aktini (SMA) ile çok sayıda, aktif stellat hücreleri gösterilir, bu hücrelerin skarlaşmadan sorumlu oldukları düşünülmektedir⁴¹. Fibröz septa oluştuğunda ve siroza doğru gidiş başladıkça parankim / mezenkim sınırında duktuler reaksiyon başlar. Prolifere olan kanal benzeri yapılar kollajen V üretir ve skarlaşmaya katkıda bulunur⁴².

Fibröz septumların oluşumuna ve hastalığın evresinin ilerlemesine paralel olarak hepatositlerin rejenerasyonu artarak belirginleşir. Rejenerasyon, karaciğer hücre tabakalarının 2 – 3 hücre genişliğince kalınlaşmasıyla belirginleşir. Hematoksilin – eozin (H&E) veya retikülin için gümüş boyaları bu değişiklikleri gösterir. Fibrotikleşen portal alanların etrafında komplet olmayan periportal nodüler dönüşüm fark edilebilir⁴³.

Patogenetik mekanizmalar

Tüm hepatotropik viral enfeksiyonlara karşı genel bir hasar ve tamir mekanizması mevcuttur. Hastalığın bazı mekanizmaları viral etkenleri kapsarken iken bir kısmı da konakçı cevabı ile ilişkilidir. Viral etkenler ve konakçı cevabının karşılıklı etkileşimi viral hepatitin gidişatını tayin eder. Son yıllarda antiviral ilaçların gelişmesiyle klinisyenler de hastalığın gidişini etkilemektedirler²⁰.

Viral etkenler gen ürünlerini içerirler. Bu gen ürünleri enfekte veya reaktif hücre popülasyonunun apoptozisine neden olur veya apoptozisini engeller^{44,45}. Hepatotropik virüslerin direk toksisitesinin de küçük bir katkısı vardır. Bu virüsler hücre aracılı immüniteyi ve sitokin etkilerini engelleyen

gen ürünleri üretirler^{46,47}. Virüsler mutasyon ile hem humoral hem de hücre aracılı immüniteden kaçabilirler⁴⁸. Konakçının enfeksiyonu engelleyecek, karaciğerden virüsü temizleyecek veya en azından viral aktiviteyi inhibe edecek pek çok yanıt mekanizması vardır. İmmünolojik olmayan yanıtlardan biri enfekte hücrenin apoptozisidir²⁰. İmmün cevaplar ise humoral ve hücre aracılı bağışıklık hücrelerinden ve parankimal veya parankimal olmayan karaciğer hücrelerinden açığa çıkan sitokinlerdir. Bu cevaplar virüse spesifik veya non spesifik olabilir⁴⁵⁻⁴⁷. İmmün sistemi dışlayarak viral enfeksiyonlar karaciğerde kronik olarak devamlılıklarını sürdürürler ve karaciğerin immün aracılı hasarını provoke ederler. Bazı hastalarda bu hasar skarlaşmaya, siroza neden olurken, bazılarında da hepatoselüler iş yükünün artmasıyla hepatoselüler karsinom gelişme riskini artırır^{49,50}.

Fibrogenezisin mekanizması:

Karaciğerde kollajen birikimi ve skar oluşumundan asıl sorumlu hücre hepatik stellat hücreleridir. Hepatik stellat hücrelerini neyin aktive ettiği bilinmemektedir, bir hipoteze göre oksidan stres anahtar etkiye sahiptir. İn vitro lipid peroksidasyon ürünleri (malondialdehid gibi) stellat hücre aktivasyonunu uyarır ve kollajen sentezine teşvik eder⁵¹. İlginç olarak, kronik hepatitte hepatosit hasarı ve fibröz septum oluşum alanlarında bu tarz ürünlerin var olduğu fark edilmiştir⁵². Bir kere aktive olduktan sonra hepatik stellat hücreleri kollajen sentezi ve birikiminin artışını regüle eden çeşitli sitokinlere yanıt verir. Bunların arasında transforme edici büyüme

faktörü β (TGF β), IL-1 ve IL-4 vardır⁵³ ve bunların çoğu, kronik viral hepatitlerde inflamatuvar yanıtta, primer veya sekonder olarak üretilmektedir⁴⁷.

Kronik hepatitte semi-kantitatif skora

Skorlama sistemlerinde gelişmeler ve uygulamalar

Kronik hepatitlerin çalışmasında ilk skorlama sistemi Knodell ve ark. tarafından geliştirilmiştir²⁰. Histolojik aktivite indeksi (HAI)'nin amacı sarılık, asit ve ensefalopati gibi klinik olayların kullanılamayacağı asemptomatik hastalarda kronik hepatitin gidişatını takip etmektir. HAI, 4 komponent üzerine kuruluydu: periportal ve köprüleşme fibrozisi; intralobuler dejenerasyon ve fokal nekroz; portal inflamasyon ve fibrozis.

Bu komponentlere verilen skorlar sırasıyla 0-10, 0-4, 0-4 ve 0-4' tüdür ve olası maksimum toplam 22 idi. Bu sistem, başlıca kronik hepatit B ve C' de tedavinin değerlendirilmesi, histolojik değişiklikler ile viral yük, viral genotip ve karaciğer fonksiyon testlerinin korelasyonu için oldukça yaygın bir şekilde kullanıldı. Pek çok skorlama sistemi bunu takip etti. Hepatit B' de delta virüs enfeksiyonu etkisinin bulunmasıyla²⁰. HAI' den daha basit bir sistem kullanıldı. Buna göre portal inflamasyon ve "interface" hepatit 0 – 4 arasında skorlandı, intralobuler inflamasyon ve nekroza da benzer skorlar tayin edildi. Bu sistem daha sonra modifiye edildi ve genişletilerek fibrozisi de içine aldı²⁰. Genişletilmiş versiyonu Batts ve Ludwig' in önerdiklerine çok benziyordu⁵⁴. Fransız araştırmacılardan oluşan bir grup (METAVIR

grubu) gözlemciler arası ve gözlemciler içindeki farklılıkları araştırmak için 27 maddenin skorlandığı bir sistem kurdular. Bu sistem ile fibrozis ve sirozun değerlendirilmesinde gözlemciler arası ve gözlemciler içindeki farklılık en azdı⁵⁰. Aynı grup, kronik hepatit C' nin aktivitesini gösteren basit bir algoritma önerdiler, bu da güve yeniği nekroz ("interface" hepatit) ve lobuler aktivite üzerine kuruluydu⁵⁵.

Nekroinflamatuvar sürecin şiddetini ve yapısal değişiklikleri birlikte içine alan kapsamlı histolojik aktivite indeksinin kullanımı 1994' te uluslararası çalışma grubu tarafından önlendi²⁰. Gradelemenin (hepatoselüler hasar ve inflamasyonun değerlendirmesi) evrelemeden (fibrozisin yaygınlığı, yapısal bozulma ve siroz) ayrılması önerildi. Bu, önceki ve sonraki skora sistemleri ile aynı çizgideydi ve Ishak ve ark. tarafından 1995 yılında Knodell sisteminin modifiye haliyle birleştirildi⁵⁶. Tablo 4 ve 5.

B. FİBROZİS

Hücre ölümü herhangi bir karaciğer hasarı formunda olabilir ve sirozu tanımlamaz. Sirozdaki asıl patojenik süreç progresif fibrozistir. Normal karaciğerde interstisyel kollajenler (tip I ve III) portal alanlarda ve santral venlerin çevresinde konsantre olurlar, arada Disse aralığında da demetler olur. Disse aralığında ince teller halinde kollajen tip IV (retikülin) de bulunur. Sirozda yaygın tip I ve tip III kollajen sadece portal alanları değil, lobulleri de dölşeyerek, ince veya geniş septal alanlar oluşturur. Sinüzoidler bazal membranı olan kapillerlere dönüşürler, böylece tam hepatosit

volümünü korumak için kan-hepatosit çözelti değiş tokuşu zayıflar⁵⁷. Ana olay perisinüzoidal (hepatik) stellat hücrelerini, ekstraselüler matriks birikimini ve parankimal mikrovasküler değişiklikleri içermektedir⁵⁸.

Perisinüzoidal (hepatik) stellat hücreler

Normal karaciğerde matriks, hepatositler, perisinüzoidal stellat hücreler ve sinüzoidal endotel hücreleri tarafından üretilebilir⁵⁸. Sirozdaki yaygın kollajenin major kaynağı perisinüzoidal stellat hücreler gibi görünmektedir⁵⁸. Bunlar Disse aralığında ve bazen hepatositler arasında perisinüzoidal alanda dinlenmede bulunurlar⁵⁸. Normalde A vitamini ve yağ depolayan hücrelerdir. Siroz gelişiminde aktive olurlar, retinil ester depolarını kaybederler ve myofibroblast benzeri hücelere dönüşürler ve immünohistokimyasal olarak SMA pozitifler⁵⁸. Aktive Kupffer hücreleri ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından sekrete edilen sitokinler, stellat hücreleri bölünmeleri ve fazla miktarda ekstraselüler matriks salgılamaları için uyarırlar⁵⁹⁻⁶¹. Stellat hücrelerinin aktivasyonu, şiddetli hepatoselüler nekroz ve inflamasyon alanlarında en fazladır⁵⁸.

Normal karaciğerde hepatik stellat hücreler, hepatositler ve sinüzoidal endotel hücreleri tip I ve tip IV kollajen sentezleme yeteneğine sahiptirler. Tip II kollajen ve fibronektin de bu hücrelerce sağlanabilir⁵⁸. Anormal derecede ekstraselüler matriks birikimi olması tamamıyla hepatik olmayan hücrelerden, özellikle stellat hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kollajen I, III,

IV ve laminin için haberci RNA sentezinde belirgin artış olur, kollajen oluşumu için hepatositlerde herhangi bir artış olmaz^{58,62}.

Ekstraselüler Matriks

Karaciğerin ekstraselüler matriksinde kollajenler, proteoglikanlar ve glikoproteinler bulunmaktadır (Tablo 2). Sirozda bunlar çok artarlar⁵⁸.

Tablo 2 : Ekstraselüler matriks komponentleri (Martinez, Hernandez & Amenta)⁶³

Komponent	Normal Dağılım
Kollajenler	
Tip I	Portal alan matriksi, hepatik venler, hepatik kordonlar
Tip III	Portal alan matriksi, Disse aralığı
Tip IV	Portal alan bazal membranı, Disse aralığı
Tip V	Portal alan matriksi, Disse aralığı
Tip VI	Portal alan matriksi, Disse aralığı
Glikoproteinler	
Laminin	Portal alan bazal membranı, Disse aralığı
Fibronektin	Portal alan matriksi, Disse aralığı
Entaktin (nidojen)	Portal alan bazal membranları
Elastin	Portal alan matriksi
Proteoglikanlar	
Heparan sülfat	Portal alan bazal membranları

Fibrogenezin regülasyonu

Kollajenin sentezi ve birikimi için uyarılar çeşitli kaynaklardan gelebilir.

- Kronik inflamasyon, inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur: Tümör nekroz faktörü α (TNF α) ve β (TNF β), interlökin-1 (IL-1), TGF β ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)
- Hasarlı endojen hücrelerden sitokin üretimi (Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, hepatositler ve safra duktus epitel hücreleri)
- Ekstraselüler matriksin bozulması
- Toksinlerle stellat hücrelerinin direk uyarımı⁶¹.

Çözünür medyatörler

Ekstraselüler matriksteki değişiklikler, stellat hücreleri ve Kupffer hücreleri tarafından üretilen proteinazlarca başlatılır²⁰.

C. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE İNHİBİTÖRLERİ

Fibroziste ve sirozda anahtar olay matriksin belirgin artışıdır. Matriksin yıkımı daha az çalışılmıştır, aslında stellat hücreleri aktive eden anahtar olay matriksin yıkımı olabilir⁵⁸.

Genelde matriksi ekstraselüler olarak yıkan metalloproteinazlar, intraselüler olarak yıkan ise lizozomal katepsinlerdir. Tüm vücutta matriksin yeniden yapılandırılmasında metalloproteinazların önemli olduğu görülmektedir, karaciğerde de anahtar rolü vardır⁵⁸. Bu proteinazlar alt gruplara ayrılır: kollajenazlar, jelatinazlar ve stromelizinler. Kollajenazlar tip I ve tip III fibriler kollajenleri, jelatinazlar tip IV, tip V kollajen ve elastini, stromelizinler

ise proteoglikanlar, glikoproteinler, jelatin, laminin ve fibronektin ile tip IV ve V kollajeni de içeren protein substratlarını yıkarlar⁵⁸ (Tablo 3). Son olarak da membran tipi MMP' ler (MT-MMP) tanımlanmıştır ve 4 alt grubu vardır (MT1-MMP – MT4-MMP). MT-MMP' lerin transmembran bir alanları vardır ve hücre yüzeyinde, aktif MT-MMP, projelatinaz-A ve TIMP-2' yi içeren üçlü kompleks halinde proteoliz yaparlar⁶⁴.

Tüm enzimler birbirleriyle sıkı ilişki içindedirler ve primer yapılarında çok sayıda, iyi korunmuş alanları vardır⁵⁸. Bu alanlardan bir tanesi, enzim aktivasyonunda önemi olan molekülün propeptid kısmındaki ardışık 80 amino asit dizisidir. Diğeri, çinko bağlayan katalitik alandır. Ek olarak özel metalloproteinazların kendilerine özel alanları vardır. Örneğin 72kD tip IV kollajenaz / jelatinazın fibronektin benzeri jelatin bağlayan alanı mevcuttur⁵⁸.

Tablo 3 : Matriks metalloproteinazlar (Friedman ve ark.⁶⁵)

Enzim	MMP no	Moleküler ağırlık		Spesifik substrat
		Pro-enzim	Aktif	
İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	57, 52	47, 42	Kollajen tip III > I > II
Nötrofil kollajenaz	MMP-8	72, 57	70, 50	Kollajen tip I > II > III
72 kD jelatinaz / tip IV kollajenaz	MMP-2	72	66	Kollajen tip IV, V?, VII, X, jelatin
92 kD jelatinaz / tip IV kollajenaz	MMP-9	92	84	Kollajen tip IV, V, jelatin
Stromelizin-1	MMP-3	60, 57	45, 28	Kollajen tip III, IV, V, laminin, proteoglikan, fibronektin, jelatin
Stromelizin-2	MMP-10	53	47, 28	Kollajen tip II, IV, V, fibronektin, jelatin
Stromelizin-3	Yok	-	-	Bilinmiyor
PUMP-1	MMP-7	28	21, 19	Kollajen tip IV, laminin, fibronektin, jelatin

İnterstisyel kollajenaz

Pek çok hücrede bulunur: fibroblastlar, düz kas hücreleri, mononükleer fagositler ve kapiller endotel hücreleri. Pre-proenzim olarak sentezlenir, daha sonra proteinazlar tarafından aktive edilir. Aktive olan enzim tip I kollajeni Gly-Ile ve Gly-Leu bağlarından parçalar. Tip II kollajeni de parçalar ancak tip IV bazal membran kollajenine etkisi yoktur⁵⁸.

İnterstisyel kollajenaz karaciğerde de bulunur, ancak selüler orijini bilinmemektedir. İlk çalışmalara göre Kupffer hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir⁵⁸, ancak sonradan Kupffer hücrelerinin diğer karaciğer sinüzoidal hücreleri ile karışık olduğu gösterilmiştir. Periferik kan monositlerinde de bu enzimin bulunması Kupffer hücrelerinin de bu enzimi ürettiğini desteklemektedir⁵⁸. Dinlenmekte olan stellat hücre interstisyel kollajenaz üretmez, ancak doku kültüründe insan karaciğerinden hazırlanan ve IL-1 veya TNF α açığa çıkaran fibroblastlar bu enzim için haberci RNA üretirler⁵⁸.

İnterstisyel kollajenaza çok benzeyen bir nötrofil kollajenaz da mevcuttur. Tip I ve tip III kollajene ilgisi daha fazladır⁵⁸. Nötrofillerin aktivasyonunu takiben sitoplazmik granüllerinde belirirler. Nötrofillerin aktif olduğu karaciğer hastalıkları (alkolik hepatit gibi) ile ilgili olabilirler⁵⁸.

Tip IV kollajenaz / jelatinazlar

Bu kategoride iki ana proteinaz mevcuttur. Biri 92kD, diğeri 72kD büyüklüktedir. Büyük olan 92 kD tip IV kollajenaz / jelatinaz esas olarak

makrofajlar ve nötrofiller tarafından sentezlenir^{58,64}. İsminden de anlaşılacağı gibi jelatin ve kollajen IV ve V' i parçalar, interstisyel fibriler kollajenleri parçalamaz. Bu enzim Kupffer hücrelerinde saptanmış olup aktivite olduklarında serbestleşir⁵⁸. 72 kD kollajenaz / jelatinaz tümör hücreleri, fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından, daha az oranda ise mononkleer fagositler tarafından sentezlenir ve serbestleştirilir. Aktive enzim jelatini, kollajen IV ve V' i yıkıma uğratar, fibriler kollajeni parçalamaz Bu açıdan 92 kD proteinaza benzer⁵⁸.

Tip IV kollajenin bölünmesi interstisyel kollajenaz gibi bir molekülün pepsine dirençli parçası tarafından sağlanır. Gly-Leu ve Gly-Ile bağlarını parçalar⁵⁸. Tip I ve tip III fibriler kollajenlere tip IV kollajenazın etkisinin olmayışı muhtemelen fibriler kollajenin tersiyer yapısından dolayı bu bağlara ulaşamayışındandır. Karaciğerde stellat hücreler bu enzimi üretir ve serbestleştirirler. Doku kültüründeki stellat hücrelerin bu enzim için haberci RNA içerdikleri gösterilmiştir Bu enzim immünohistokimyasal olarak da bu hücrelerde gösterilmiştir⁵⁸.

Stromelizinler

Değişik dokularda 3 stromelizin (1, 2, 3) ve sıkı ilişkili metalloproteinaz, PUMP-1 tanımlanmıştır. Bu enzimlerin geniş, matriks yıkım aktivitesi vardır, ancak hiçbiri karaciğerde net olarak tanımlanmamıştır⁵⁸.

Metalloproteinaz Regülasyonu

Matriks metalloproteinazların biyosentezi ve aktiviteleri ekstraselüler boşluktaki matriks proteinlerinin yıkımını kontrol altına almak için sıkı bir şekilde düzenlenir (Tablo 4). Bu, morfogenez, organogenez, doku rejenerasyonu ve tamiri veya yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemlidir. Aksine, metalloproteinazların kontrolü bozulursa neoplazi / metastaz, bağ doku yıkımı ve fibrozis gibi patolojik süreçler ortaya çıkar. Prometalloproteinaz biyosentezi gen transkripsiyonu evresinde, ekstraselüler aktivite ise, salgılanan proenzimlerin aktivasyonu veya aktif formların spesifik inhibisyonu ile düzenlenir⁶⁶.

Metalloproteinaz genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde, bir kısmı diğer aile üyeleriyle ortak, bir kısmı ise bazı metalloproteinazlara özel bir çok değişik faktör görev alır. Özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve retinoidler önemlidir. Bunlardan, karaciğer fibrozisinin patogenezinde de önemi olan $TGF\beta_1$ ve retinoidlerin matriks metalloproteinazlar üzerinde de derin etkileri vardır. $TGF\beta_1$ ' in metalloproteinaz ailesinin değişik üyelerine etkileri farklıdır; 72 kDa tip IV kollajenaz ekspresyonunu artırırken, stromelizin ve interstisyel kollajenaz ekspresyonunu azaltır. Retinoik asit de interstisyel kollajenaz ekspresyonunu inhibe eder. $TGF\beta_1$ ' in ve retinoidlerin metalloproteinaz inhibitörleri üzerine de belirgin uyarıcı etkileri vardır. Karaciğerdeki tüm etkilerine bakıldığında fibriler interstisyel matriksin yıkımını engellerler ve karaciğer fibrozisinin ilerlemesine öncülük ederler⁶⁶.

Tablo 4: Metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin ekspresyonunu düzenleyen faktörler⁶⁶.

	Metalloproteinazlar	Metalloproteinaz inhibitörleri
TGFβ₁	İnterstisyel kollajenaz ↓ Stromelizin ↓ 72 kDa tip IV kollajenaz ↓	TIMP-1 ↑, TIMP-2 ↓
Retinoik asit IL-1, TNF-α, PDGF EGF, b-FGF	İnterstisyel kollajenaz ↓ İnterstisyel kollajenaz ↑ İnterstisyel kollajenaz ↑	TIMP-1 ↑, - TIMP-1 ↑,

Metalloproteinaz inhibitörleri

Dokuya özel TIMPler ve α_2 -makroglobulin gibi genel proteinaz inhibitörleri tanımlanmıştır⁵⁸. TIMP ailesinin en az 4 üyesi vardır: TIMP-1, -2, -3 ve -4. Hepsinin aktif MMP' lere yüksek afinitesi mevcut olup, kovalan olmayan ve geri dönüşümsüz kompleksler oluştururlar⁶⁷. TIMP-1 ve -2 çözünebilir inhibitörler iken, TIMP-3 ekstraselüler matrikse (ECM) bağlanan ve erimeyen bir inhibitördür⁶⁷. Proteolitik hasardan sonra ECM yeniden yapılanmaya başlar. MMP' lerin daha fazla iş yapmasını engellemek için buna TIMP' lerde artış da eşlik eder⁶⁷.

TIMP-1 28 kD' luk bir glikoprotein olup fibroblastları da içeren pek çok hücre tarafından salgılanır. Aktif metalloproteinazların tüm tiplerine geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Stellat hücrelerin TIMP-1 geni eksprese ettikleri, immünreaktif protein sentezledikleri ve kültürde süpernatana TIMP-1 aktivitesi olan bir protein serbestleştirdikleri gösterilmiştir^{58,68}.

Metalloproteinazların gen ekspresyonunu düzenleyen büyüme faktörleri ve sitokinlerin aynıları tarafından gen ekspresyonları düzenlenir⁵⁸.

TIMP-2 daha küçük, 21 kD protein olup TIMP-1' e benzer özellikler taşır. Karaciğerde bugünkü rolünün ne olduğu bilinmemektedir⁵⁸.

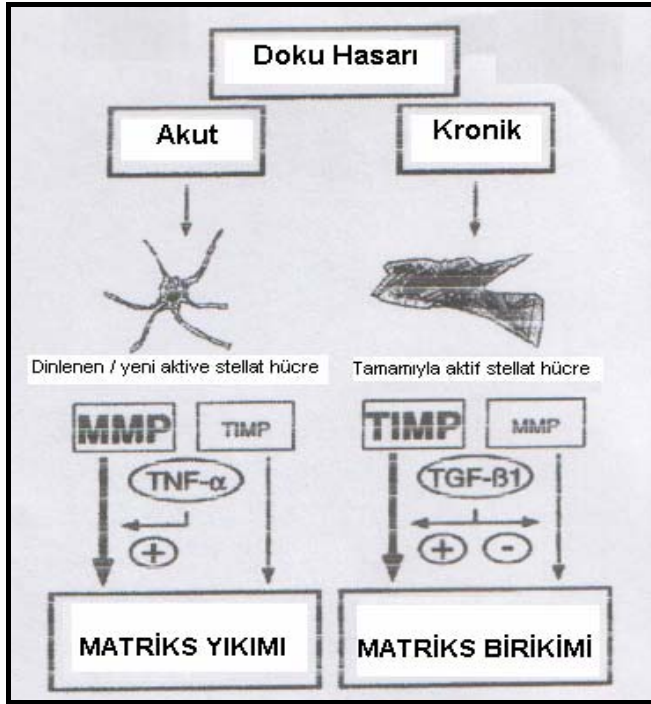
α_2 -makroglobulin yüksek moleküler ağırlıklı (725 kD) plazma glikoproteinidir. İnterstisyel kollajenaz ve stromelizinin ikisini de bağlayabilir⁵⁸. Asıl olarak hepatositlerden sentezlenirler, ancak stellat hücreler de bu proteinaz inhibitörü için haberci RNA içerir ve bu molekülü sentezlerler⁵⁸.

Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve karaciğer fibrozisi

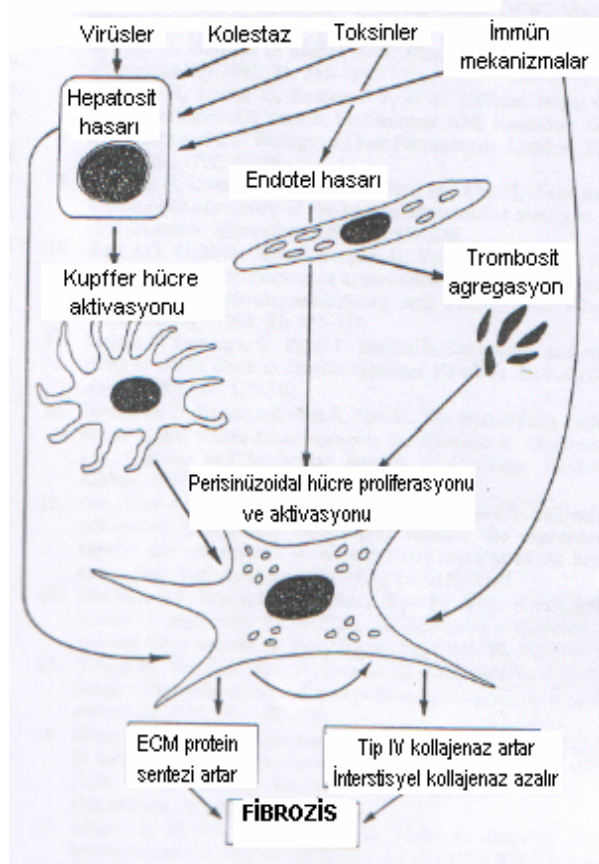
Karaciğer matriksinin üretimi ve korunmasında, perisinüzoidal stellat hücrelerin başrolde olduğu, metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin etkilediği, kompleks karşılıklı etkileşim vardır. Karaciğerde aşırı matriks üretim nedenleri arasında; perisinüzoidal stellat hücrelerden artmış interstisyel kollajen yapımı, metalloproteinazların azalmış aktivitesi veya metalloproteinaz inhibitörlerinin artışı vardır. Metalloproteinazlar, özellikle tip IV kollajenaz, normal karaciğer matriksini bozarak, stellat hücre aktivasyonu ve matriks üretimi için mikro-ortam yaratabilir⁵⁸.

Karaciğer fibrozisinde interstisyel kollajenaz aktivitesi artar. CCl₄ ile tedavi edilmiş ratların fibrotik karaciğerlerinin tip I kollajeni normal karaciğere göre daha kolayca yıktıkları görülmüştür⁵⁸ (Resim 1, 2). Bu aktivite erken ve geniş lezyonlarda daha fazla iken, siroza ilerlemiş vakalarda azalır. Bu artmış aktivite fibrozisi engellemek için yeterli değildir. Total karaciğer

kollajen içeriğine göre total interstisyel kollajenaz akitivitesi azalır⁵⁸. Normal veya hastalıklı karaciğerde interstisyel kollajenaz doku inhibitörleri hakkında çok az bilgi vardır. Tüm bu faktörlerin karşılıklı etkileşiminin anlaşılmasıyla kronik karaciğer hastalığının siroza ilerlemesi yavaşlatılabilir, hatta durdurulabilir⁵⁸.



Resim: 1
Karaciğer hücre hasarında hepatik stellat hücresi ile $TNF\alpha$ ve $TGF\beta$ 'nin ECM yıkımındaki rolleri



Resim: 2
Hepatik fibrojenizde hücreler arası etkileşim

III- YÖNTEM

Bu çalışmaya, 1994-2004 yılları arasında Başkent Üniversitesi hastanesinde, kronik viral hepatit tanısı almış 67 hasta dahil edildi.

Histolojik olarak kronik hepatit B ile uyumlu 27 hasta, kronik hepatit C ile

uyumlu 40 hasta ve karaciğer transplantasyon vericilerine ait 5 adet normal

karaciğer dokusu çalışmaya alındı. Tanı aldıkları zaman hastaların ortalama yaşı 44,39 (12 – 73 yaş) olup, erkek / kadın oranı 1,8 idi.

Çalışmaya dahil edilen biyopsi materyalleri %10'luk formalin solusyonunda fikse edilmiş olup, takip işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Tüm olguların 3 µ kalınlığında, hematoksilin-eozin (H&E), Masson Trikrom, retikülin ve PAS boyalı kesitleri mevcuttur. Kesitler, Modifiye Knodell'e göre

grade'lendirme ve evrelendirme yapılarak yeniden değerlendirildi ve histopatolojik tanıları verildi. (Tablo 5, 6)

Karaciğer iğne biyopsisi içeren bloklardan hazırlanan kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, MMP-2 (Ab-3, monoclonal mouse, clone: 42-5D11, Oncogene), MMP-9 (Ab-3, monoclonal mouse, clone: 56-2A4, Oncogene), TIMP-1 (Ab-2, monoclonal mouse, clone: 147-6D11, Oncogene) ve TIMP-2 (Ab-2, monoclonal mouse, clone: 67-4H11, Oncogene)' e karşı monoklonal antikorlar ile standart avidin – biotin kompleks yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Ekspresyon yoğunluğu ve yaygınlığı semikantitatif olarak değerlendirildi. Skorum 4 grupta sınıflandırıldı:

0: ekspresyon yok; 1: düşük ekspresyon; 2: orta ekspresyon; 3: yüksek ekspresyon.

MMP ile TIMP varlığı ve yoğunluğu ile hastalığın evresi arasındaki ilişki istatistiksel olarak araştırıldı.

İstatistiksel Analiz:

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 11.0 paket programı ile yapıldı. Mann Whitney-U testi kullanılarak birçok parametre karşılaştırıldı. Ortalama değer, standart deviasyon (SD) ve p değerleri hesaplandı.

Analizler sonucunda $P < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

Tablo 5 : Kompleks gradeleme sistemi (Ishak ve ark.dan sonra⁵⁶).

A- Periportal veya periseptal “İnterface” hepatit (güve yeniği nekrozu)	
Yok	0
Hafif (fokal, birkaç portal alan)	1
Hafif / orta (fokal, portal alanların çoğu)	2
Orta (Septumların ve portal alanların <50 %' de devamlı)	3
Şiddetli (Septumların ve portal alanların >50 %' de devamlı)	4
B- Konfluent nekroz	
Yok	0
Fokal	1
Bazı alanlarda zon 3 nekroz	2
Çoğu alanda zon 3 nekroz	3
Zon 3 nekroz + arada portal-santral (PS) köprüleşme	4
Zon 3 nekroz + birçok PS köprüleşme	5
Panasiner veya multiasiner nekroz	6
C- Fokal (spotty) litik nekroz, apopitoz ve fokal inflamasyon	
Yok	0

X 10 objektifte ≤ 1 odak	1
X 10 objektifte 2 - 4 odak	2
X 10 objektifte 5 - 10 odak	3
X 10 objektifte >10 odak	4
D- Portal inflamasyon	
Yok	0
Hafif, portal alanların bazısında veya tümünde	1
Orta, portal alanların bazısında veya tümünde	2
Orta / belirgin, tüm portal alanlarda	3
Belirgin, tüm portal alanlarda	4
Maksimum olası toplam skor	18

Tablo 6 : Evreleme sistemi (Ishak ve ark.dan sonra⁵⁶)

Değişiklik	Skor
Fibrozis yok	0
Bazı portal alanlarda kısa septalı veya septasız fibröz genişleme	1
Portal alanların çoğunda, kısa septalı veya septasız fibröz genişleme	2
Portal alanların çoğunda fibröz genişleme, arada porto portal (P-P) köprüleşme	3
Portal alanlarda fibröz genişleme ile birlikte belirgin P-P ve P-S köprüleşme	4
Belirgin köprüleşme (P-P ve/veya P/C) ile arada nodüller (inkomplet siroz)	5
Siroz, olası veya kesin	6
Maksimum olası skor	6

IV- BULGULAR

Çalışmamızdaki normal karaciğerlerde MMP-2 ve MMP-9 sinüzoidal hücreler tarafından eksprese ediliyordu. Kapiller endotel hücreleri ve portal alandaki safra duktus hücreleri de her iki antikorla zayıf boyandılar.

TIMP-2 ile kapiller endotel hücrelerinde ve safra duktus hücrelerinde zayıf boyanma saptandı, ancak normal karaciğerde TIMP-1 ile boyanma görülmedi. Normal karaciğerde hepatositlerde antikorların hiçbiri ile boyanma saptanmadı.

Viral hepatitte, etyolojide HBV veya HCV' den bağımsız olarak, MMP-9 vakaların 3%' ünde, hepatositlerde boyanırken, MMP-2, vakaların 43%' ünde hepatositlerde ve bazı içsi hücrelerde boyandı.

TIMP-1 ve TIMP-2 ile hepatositlerde, sinüzoidal hücrelerde ve içsi hücrelerde sırasıyla 12 % ve 21 % oranında boyanma izlendi. Sadece TIMP-1 ekspresyonu MMP-2 ekspresyonu ile koreleydi ($p=0.01$). Diğer yandan ne MMP-2 ve MMP-9, ne de TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonları inflamasyonun yaygınlığı ve fibrozis ile korelasyon göstermedi.

Yaş, cinsiyet, böbrek yetmezliği gibi parametrelerden hiçbiri MMP ve TIMP ekspresyonları ile istatistiksel olarak birliktelik göstermedi.

Sonuçlar Tablo 7 ve 8' de özetlenmiştir.

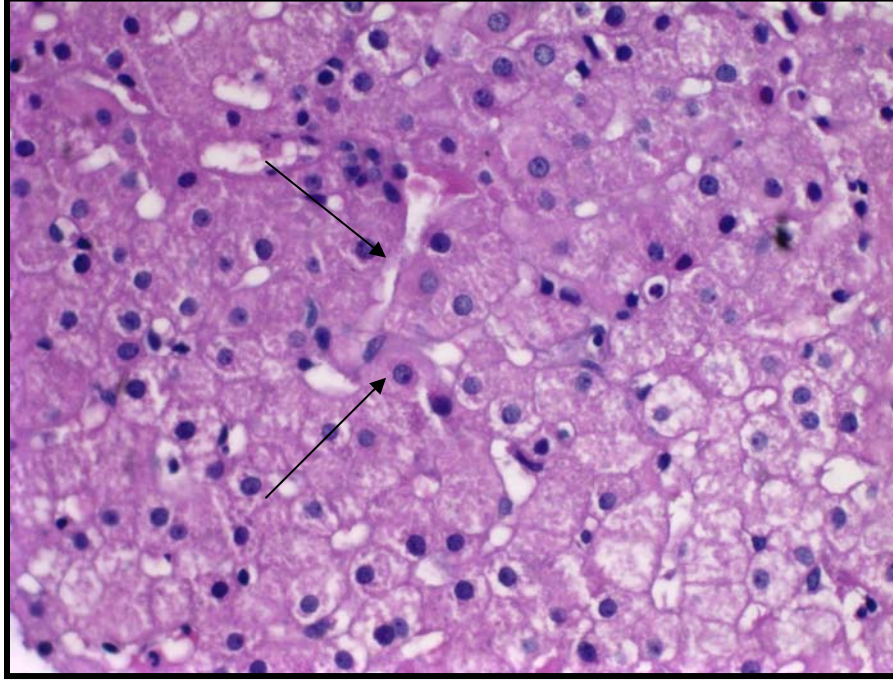
Tablo 7: Hastalara ait klinik ve histopatolojik bulgular

Vaka	Yaş	Cinsiyet	KBY	Klinik	Aktivite şiddeti	Fibrozis skor	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
1	61	K	0	HCV	hafif	1	2	0	1	1
2	20	K	0	HBV	minimal	0	2	1	1	0
3	22	E	1	HCV	minimal	1	1	0	0	1
4	34	E	1	HCV	minimal	0	2	0	0	1
5	52	E	0	HBV	hafif	0	2	0	0	0
6	46	E	1	HBV	minimal	0	0	0	0	0
7	28	E	0	HBV	minimal	3	0	0	0	0

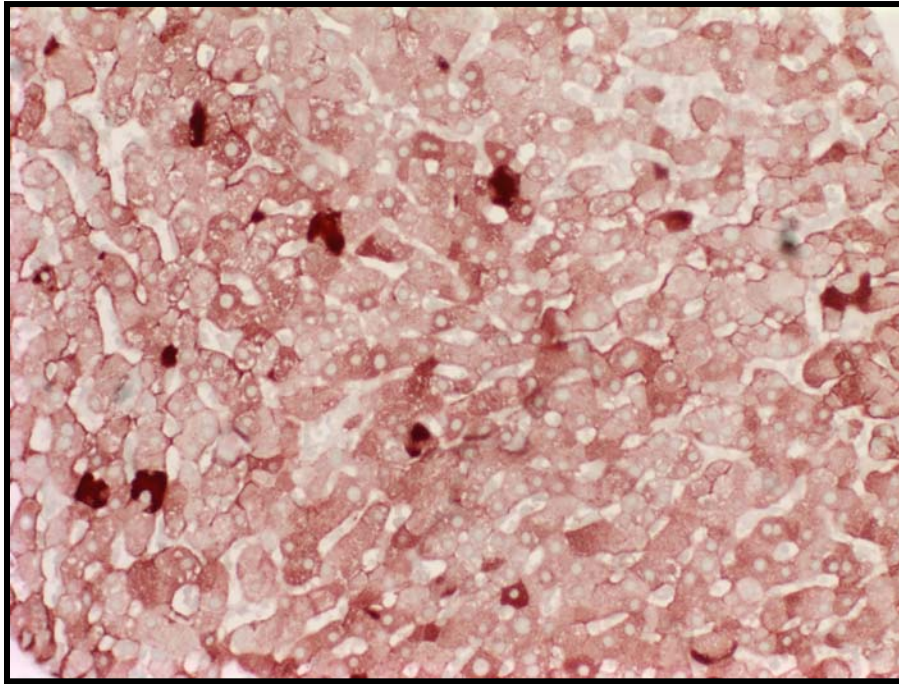
8	40	E	1	HCV	orta	3	1	0	0	0
9	60	K	1	HCV	hafif	1	0	0	0	0
10	66	E	1	HCV	hafif	1	2	0	0	1
11	57	K	0	HCV	minimal	1	0	0	1	1
12	16	K	1	HCV	minimal	1	1	0	1	0
13	25	E	1	HCV	minimal	1	2	0	1	0
14	60	K	0	HCV	hafif	2	0	0	0	1
15	29	E	1	HBV	minimal	1	0	0	0	0
16	42	E	1	HBV	minimal	1	0	0	0	0
17	33	E	0	HBV	minimal	1	0	0	0	0
18	51	K	0	HCV	hafif	2	0	0	0	0
19	20	K	0	HCV	minimal	1	0	0	0	0
20	40	E	1	HCV	hafif	1	0	0	0	0
21	70	K	0	HCV	minimal	1	0	0	0	0
22	38	E	0	HBV	minimal	3	0	0	0	0
23	37	E	0	HBV	minimal	1	0	0	0	0
24	58	K	0	HCV	minimal	1	0	0	0	1
25	65	E	0	HBV	minimal	0	0	0	0	0
26	68	E	0	HBV	minimal	2	0	0	0	1
27	39	K	0	HCV	minimal	1	0	0	0	0
28	49	K	0	HCV	hafif	3	0	0	0	0
29	50	E	0	HBV	orta	2	0	0	0	0
30	60	E	0	HCV	minimal	1	1	0	0	0
31	13	E	0	HBV	minimal	1	0	0	0	0
32	48	K	1	HCV	minimal	0	0	0	0	1
33	24	E	0	HCV	hafif	0	0	0	0	2
34	56	K	0	HCV	orta	3	0	0	0	0
36	53	E	0	HBV	hafif	1	0	0	0	0

36	52	E	0	HBV	orta	3	0	0	0	0
37	41	E	1	HCV	orta	3	0	0	0	0
38	73	E	0	HCV	hafif	1	0	0	0	0
39	29	E	1	HCV	minimal	1	1	0	0	0
40	47	E	0	HBV	orta	3	1	0	0	0
41	41	K	0	HCV	minimal	1	1	0	0	0
42	26	E	0	HBV	hafif	1	2	1	0	1
43	12	K	0	HBV	hafif	3	1	0	0	1
44	69	K	0	HCV	hafif	1	1	0	0	0
45	48	E	0	HBV	minimal	0	0	0	0	0
46	42	K	0	HCV	minimal	0	0	0	0	0
47	42	E	0	HBV	hafif	3	0	0	0	0
48	70	K	0	HCV	hafif	1	0	0	0	0
49	50	K	1	HCV	minimal	0	0	0	0	0
50	70	E	0	HBV	minimal	3	1	0	1	0
51	50	E	0	HCV	minimal	0	0	0	0	0
52	46	K	1	HCV	minimal	1	1	0	1	0
53	31	E	0	HBV	hafif	0	1	0	0	0
54	42	E	1	HCV	hafif	1	1	0	0	0
55	34	E	1	HCV	hafif	2	0	0	0	0
56	37	E	0	HBV	orta	1	0	0	0	0
57	56	E	0	HBV	hafif	5	1	0	0	0
58	45	K	0	HCV	hafif	1	0	0	0	0
59	56	K	0	HCV	orta	1	1	0	0	0
60	27	E	0	HBV	şiddetli	1	2	0	0	0
61	50	E	1	HCV	şiddetli	2	1	0	0	0
62	27	E	0	HBV	orta	4	0	0	0	0
63	57	E	0	HCV	orta	1	1	0	0	1

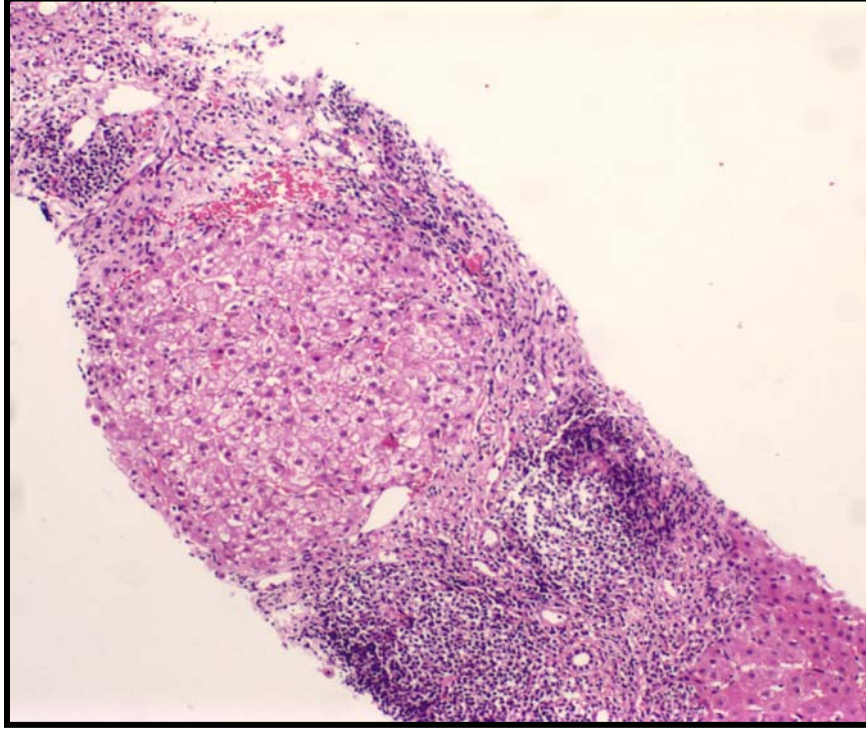
64	48	E	1	HCV	orta	3	1	0	0	1
65	43	E	0	HBV	orta	1	1	0	0	0
66	37	E	1	HCV	orta	1	0	0	1	0
67	46	K	0	HCV	orta	3	1	0	0	0



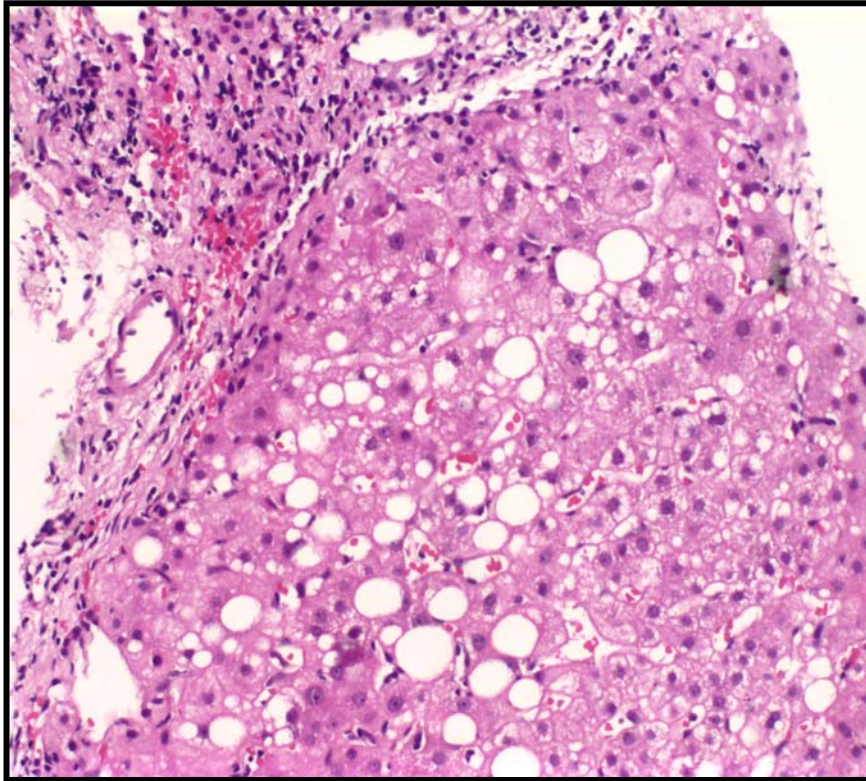
Resim 3: Hepatit B' de bazı hepatositlerin sitoplazmasında buzlu cam görünümü (x400 H&E)



Resim 4: Hepatit B yüzey antijenine karşı antikor kullanarak immünohistokimyasal boyamada bazı hepatositlerin sitoplazmalarında HBsAg ekspresyonu görülüyor. (İmmünperoksidaz, X 200)

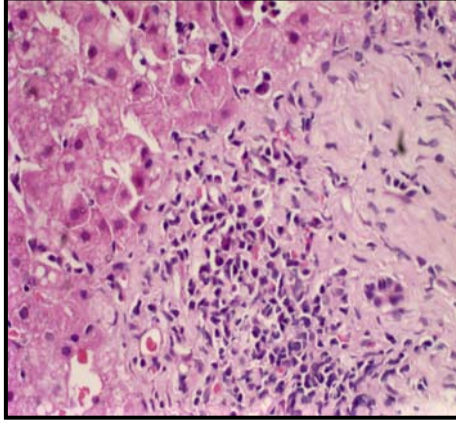


Resim 5: Hepatit C' de portal alanda lenfoid agragatlar (H&E X 100)

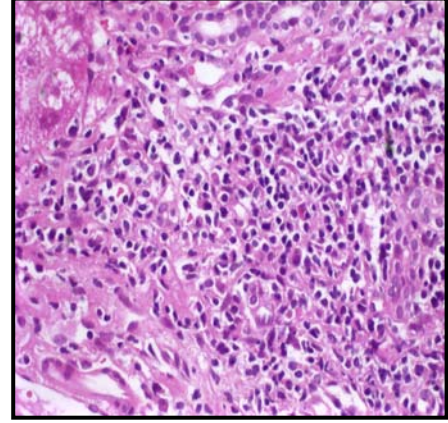


Resim 6: Hepatit C' de karaciğer parankiminde makro-mikroveziküler

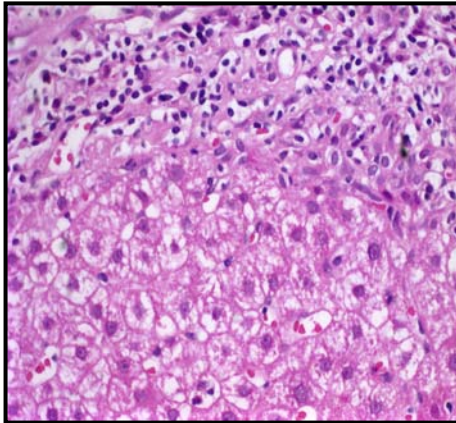
yađlı deđiřim (H&E X200)



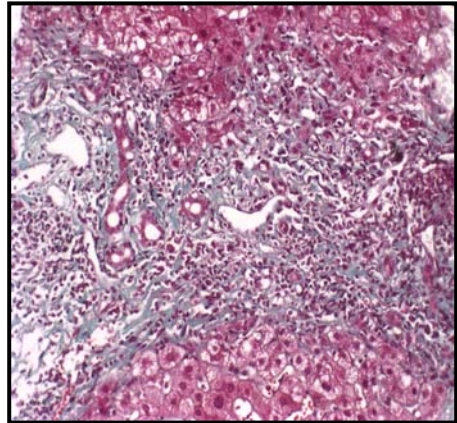
Resim 7: Portal alanı genişleten mononükleer inflamasyon, (H&E x400)



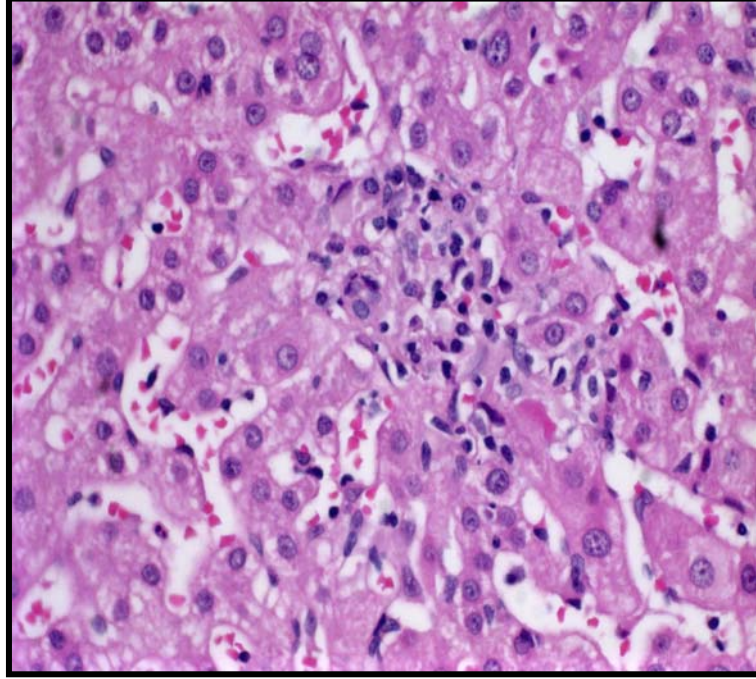
Resim 8: Portal alanı genişleten ve "limiting plate" i aşan inflamasyon, "interface" hepatit (H&E X400)



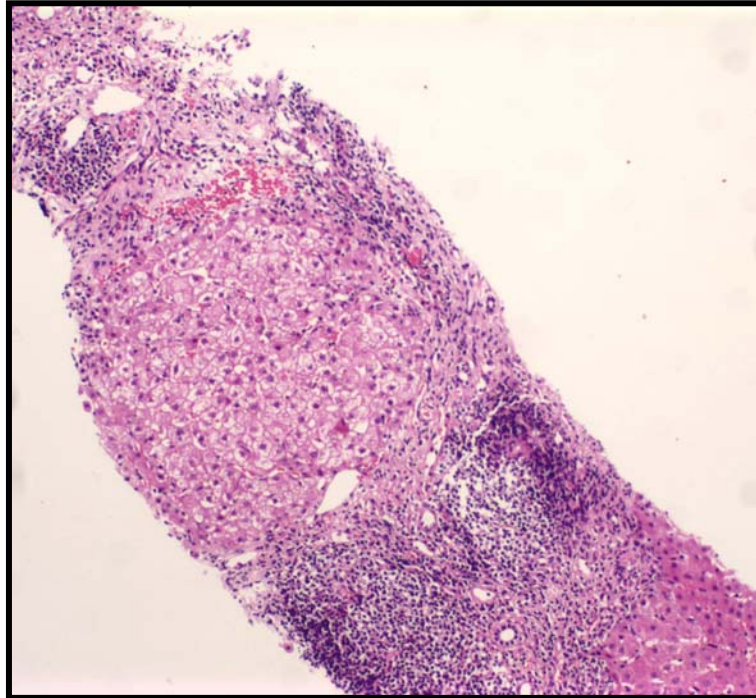
Resim 9: "İnterface" hepatit (H&E x400)



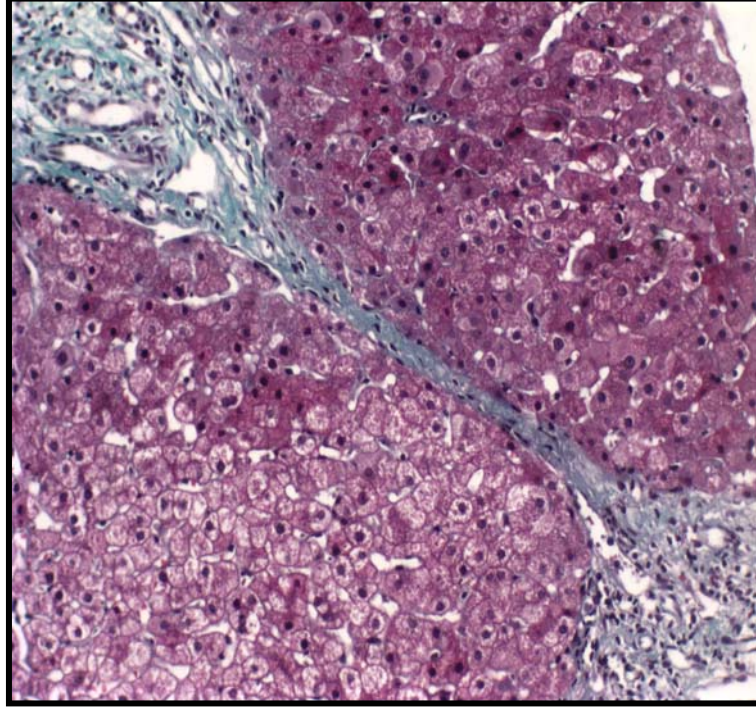
Resim 10: "İnterface" hepatit (Masson trikrom x200)



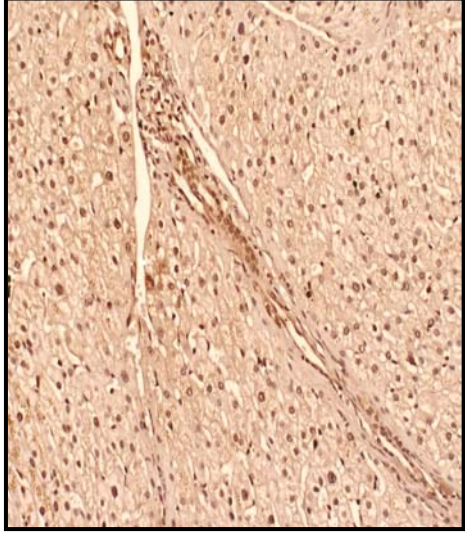
Resim 11: "Spotty" nekroz odağı (H&E x400)



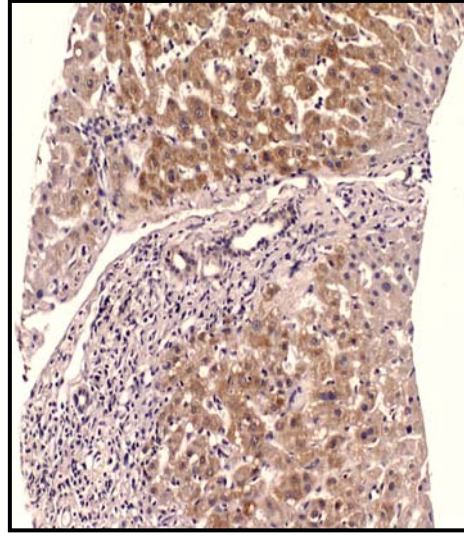
Resim 12: Hepatit C' de köprüleşme fibrozisi (H&E x40)



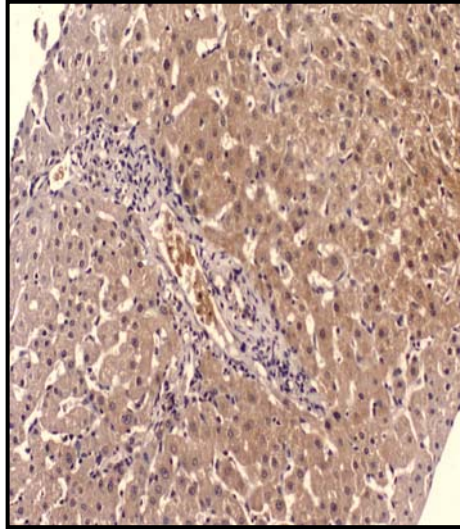
Resim 13: Hepatit B' de köprüleşme fibrozisi
(Masson trikrom, x200)



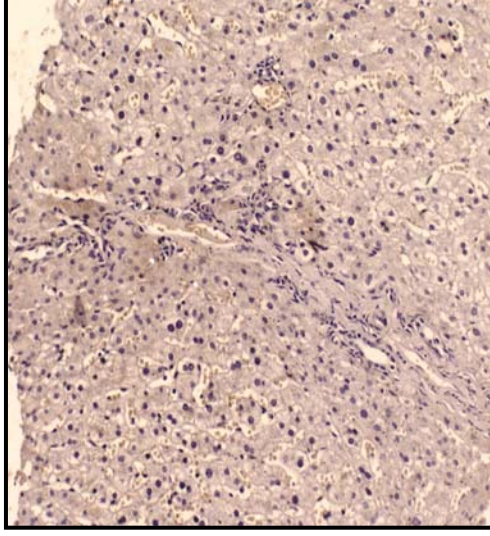
Resim 14: Normal karaciğerde
MMP-2 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 200)



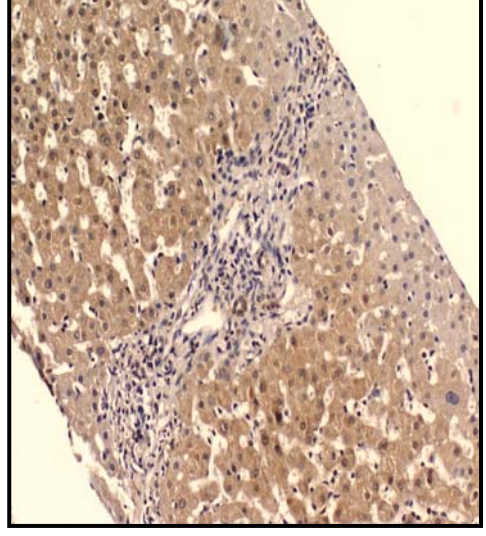
Resim 15: Kronik viral B hepatitte
MMP-2 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 100)



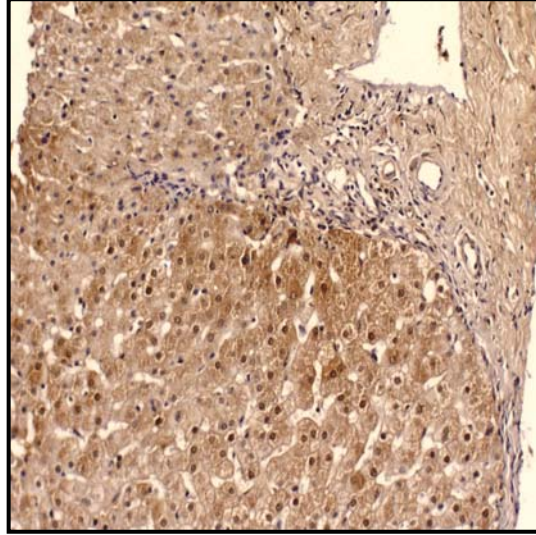
Resim 16: Kronik viral B hepatitte
MMP-9 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 100)



Resim 17: Normal karaciğerde
TIMP-1 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 200)



Resim 18: Kronik viral B hepatitte
TIMP-1 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 100)



Resim 19: TIMP-2 ekspresyonu
(immünperoksidaz x 200)

Tablo 8: Hastaların klinik ve histopatolojik bulgularının oranları

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Yaş				
≤50	19 (42,2%)	2 (4,4%)	5 (11,1%)	7 (15,5%)
>50	9 (40,9%)	0	3 (13,6%)	7 (31,8%)
Cinsiyet				
F	9 (37,5%)	1 (4,2%)	5 (20,8%)	6 (25%)
M	19 (44,2%)	1 (2,3%)	3 (7%)	8 (18,3%)
Kronik böbrek yetmezliği				
+	11 (52,4%)	0	4 (19%)	5 (23,8%)
-	17 (37%)	2 (4,3%)	4 (8,7%)	9 (19,6%)
Etyoloji				
HBV	10 (37%)	2 (7,4)	2 (7,4%)	3 (11,1%)
HCV	18 (45%)	0	6 (15%)	11 (27,5%)
Nekroinflamatuvar skor				
Minimal	10 (33,3%)	1 (3,3%)	6 (20%)	6 (20%)
Mild	9 (42,8%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)	6 (28,5%)
Moderate	7 (50%)	0	1 (7,1%)	2 (14,2%)
Severe	2 (100%)	0	0	0
Evreleme				
0	4 (33,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	3 (25%)
1	16 (66,6%)	1 (41%)	6 (25%)	7 (29,1%)
2	1 (16,6%)	0	0	2 (33,3%)
3	6 (46,1%)	0	1 (7,6%)	2 (15,3%)
4	0	0	0	0
5	1 (100%)	0	0	0

V- TARTIŞMA

Kronik hepatitli hastalarda fibroproliferasyon belirteci olarak birçok biyokimyasal parametre kullanılmıştır. Bunların içinden MMP ve TIMP'lerin, kronik viral hepatitli hastalarda inflamatuvar aktivite ve siroz gelişimi ile korele olduğu birçok araştırmacı grup tarafından gösterilmiştir. Lichtinghagen ve arkadaşları, 2000 yılında yayınlanan bir çalışmalarında kronik hepatit C' de hastalığın ilerlemesiyle proMMP2, TIMP1 ve TIMP2 konsantrasyonlarının arttığını ve MMP9 konsantrasyonunun azaldığını bildirmişlerdir². Benzer şekilde Murawaki ve arkadaşları sağlıklı kontrol grubu ile kronik hepatit C' nin son evreleri karşılaştırıldığında TIMP1' in giderek yükseldiğini bulmuşlardır¹. Başka bir çalışmalarında kronik viral karaciğer hastalığının tanısında serum MMP2 düzeyinin ölçülmesinin yararlı bir test olabileceğini belirtmişlerdir⁴. Walsh ve arkadaşları kronik hepatit C' de serumda MMP-2 ve TIMP-1 konsantrasyonlarının arttığını bildirmişler, ancak MMP-2 konsantrasyonu ile histoloji arasında korelasyon bulamamışlardır⁵. Takahara ve arkadaşları kronik hepatitlerde ve karaciğer sirozunda immünohistokimyasal yöntemle MMP-2 ve MT1-MMP ekspresyonunu incelemişler ve MMP-2 ile MT1-MMP' nin sinüzoidal hücrelerde, fibroblastlarda, kapiller endotel hücrelerinde, lenfositlerde ve safra duktus hücrelerinde eksprese olduğunu görmüşlerdir¹⁹. Başka bir çalışmada Yata ve arkadaşları hepatik fibroziste immünohistokimyasal yöntemle, TIMP-1' in ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır¹⁸. Ancak her iki

çalışmada da kronik hepatitli olgu sayısı çok azdı. Reif ve arkadaşları serum MMP' lerinden özellikle MMP-9' un kronik HCV' li hastalarda fibrozisin evresinden ziyade hastalığın aktivitesini gösterebileceğini bildirmişlerdir⁶⁹.

Bizim çalışmamızda, viral hepatitte hepatositlerin MMP ve TIMP' leri bir ölçüye kadar eksprese ettiklerin gördük. Normal karaciğerde TIMP1 ekspresyonu görülmezken, kronik virall hepatitte, HBV veya HCV' den bağımsız olarak vakaların 12%' sinde TIMP-1 ekspresyonu olduğunu gördük. Ek olarak vakaların çok azında (3%) MMP-9 ile hepatositlerde sitoplazmik pozitiflik vardı. Hepatositlerde MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-2' nin ekspresyonu daha belirgindi. İnflamasyonun ve fibrozisin yaygınlığı ile MMP ve TIMP' lerin ekspresyon paternleri arasında korelasyon mevcut değildi.

MMP ve TIMP' lerin serum düzeylerinin kronik hepatit gelişimi ile korele olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiş olsa da, bizim bulgularımıza göre viral hepatitlerde MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyon paternleri serum konsantrasyonundaki değişiklikleri açıklamaz ve hastalığın ilerlediğini göstermez. Bu nedenle dolaşımdaki seviyelerinin karaciğere spesifik olduğu hala anlaşılmamıştır.

VI- ÖZET

Kronik hepatitte prognozu belirleyen şey fibrozisin ilerlemesidir. Ancak fibroproliferatif aktiviteyi değerlendirmek zordur ve bunun için geliştirilmiş, invaziv olmayan test veya belirteçler henüz yoktur.

Bu çalışmada; kronik viral hepatitli hastaların karaciğer biyopsilerinde, matriks metalloproteinaz ve doku inhibitörlerinin immünohistokimyasal olarak ekspresyon paternini saptayarak, viral hepatitin grade ve evresi ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya histopatolojik olarak kronik hepatit B ile uyumlu 27 hastanın, hepatit C ile uyumlu 40 hastanın karaciğer biyopsileri ile karaciğer transplantasyon vericilerine ait 5 adet normal karaciğer biyopsileri dahil edilmiştir.

Kesitler, Modifiye Knodell'e göre grade'lendirme ve evrelendirme yapılarak yeniden değerlendirildi ve histopatolojik tanıları verildi.

Karaciğer iğne biyopsisi içeren bloklardan hazırlanan kesitlere, MMP-2 (Ab-3, monoclonal mouse, clone: 42-5D11, Oncogene), MMP-9 (Ab-3, monoclonal mouse, clone: 56-2A4, Oncogene), TIMP-1 (Ab-2, monoclonal mouse, clone: 147-6D11, Oncogene) ve TIMP-2 (Ab-2, monoclonal mouse, clone: 67-4H11, Oncogene)' e karşı monoklonal antikorlar ile standart avidin – biotin kompleks yöntemi kullanılarak

immünohistokimyasal boyama yapıldı. Ekspresyon yoğunluğu ve yaygınlığı semikantitatif olarak değerlendirildi. Skorlama 4 grupta sınıflandırıldı: 0: ekspresyon yok; 1: düşük ekspresyon; 2: orta ekspresyon; 3: yüksek ekspresyon.

MMP ile TIMP varlığı ve yoğunluğu ile hastalığın evresi arasındaki ilişki istatistiksel olarak araştırıldı.

Buna göre sadece TIMP-1 ekspresyonu MMP-2 ekspresyonu ile koreledi ($p=0.01$). Diğer yandan ne MMP-2 ve MMP-9, ne de TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonları inflamasyonun yaygınlığı ve fibrozis ile korelasyon göstermedi.

Yaş, cinsiyet, böbrek yetmezliği gibi parametrelerden hiçbiri MMP ve TIMP ekspresyonları ile istatistiksel olarak birliktelik göstermedi.

MMP ve TIMP'lerin serum düzeylerinin kronik hepatit gelişimi ile korele olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiş olsa da, bizim bulgularımıza göre viral hepatitlerde MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyon paternleri serum konsantrasyonundaki değişiklikleri açıklamaz ve hastalığın ilerlediğini göstermez. Bu nedenle dolaşımdaki seviyelerinin karaciğere spesifik olduğu hala anlaşılmamıştır.

VII- KAYNAKLAR

- 1-** Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001;36(6):399-406
- 2-** Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000 Feb;46(2):183-92
- 3-** Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999 Sep;31(3):474-81
- 4-** Murawaki Y, Yamada S, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol* 1999 Jun;30(6):1090-8
- 5-** Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers

of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999 Mar;44(3):624-30

6- Kuo WH, Chou FP, Lu SC, Chu SC, Hsieh YS. Significant differences in serum activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 between HCV- and HBV-infected patients and carriers. *Clin Chim Acta* 2000 Apr;294(1-2):157-68

7- Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002 Feb;316(1-2):71-81

8- Sternlicht MD and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516

9- Yong VW, Craig AK, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 1998;21:75-80

10- Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1998; 153:429-37

11- Nakano A, Tani E, Miyazaki K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *J Neurosurg* 1995; 83:298-307

12- Ribatti D, Surico G, Vacca A, Leonardis FD, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 2001;68:1161-1168

13- Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, p53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(2):206-15.

14- Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, Offidani A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer.* 2002 1;95(9):1963-70.

15- Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, Klein C, Passlick B, Pantel K. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003 20;103(5):647-51.

16- Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1260-1270

17- Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001 Feb;34(2):239-47

18- Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Jin B, Watanabe A. Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol* 1999; 30: 425-432

- 19-** Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997; 26(6):1521-1529
- 20-** MacSween RNM, Burt Ad, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP. Acute and chronic viral hepatitis. In: Ferrell LD, Theise ND, Scheuer PJ, eds. *Pathology of The Liver*, 4th edn, Philadelphia: Elsevier Science, 2003; pp: 313-362
- 21-** DiBisceglie AM, Hoofnagle JH. Chronic Viral Hepatitis. In: Zakim D, Boyer TD, eds. *Hepatology: a textbook of liver disease*. W.B. Saunders Co, pp: 1299-1329
- 22-** Fogarty International Center Criteria Committee. Diseases of the liver and biliary tract. Standardization of nomenclature, diagnostic criteria, and diagnostic methodology. Washington: US Government Printing Office, 1976; pp 9-11
- 23-** Millward –Sadler GH. Liver cirrhosis. In: MacSween RNM, Anthony P, ScheuerPJ, Portmann B, Burt AD, eds. *Pathology of the liver*, 3rd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: pp 397-424
- 24-** De Groote J, Desmet V, Gedigk P et al. A classification of chronic hepatitis. *Lancet*, 1968; ii: 626-628
- 25-** Poulsen H, Christoffersen P. Atlas of liver biopsies. Copenhagen: Munksgaard, 1979; pp 35-39
- 26-** Bianchi L. Liver biopsy interpretation in hepatitis. Part I. Presentation of critical

morphologic features used in diagnosis (glossary). *Pathol Res Pract*. 1983 Aug;178(1):2-19.

27- Poulsen H, Christoffersen P, Dietrichson O, Faber V. The occurrence and significance of abnormal bile duct epithelium in cirrhosis. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1972;80(5):659-64.

28- Schmid M, Pirovino M, Altorfer J, Gudat F, Bianchi L. Acute hepatitis non-A, non-B; are there any specific light microscopic features? *Liver*. 1982 Mar;2(1):61-7.

29- Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology*. 1992 Apr;15(4):567-71.

30- Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology*. 1995 May;21(5):1238-47.

31- Popper H, Paronetto F, Schaffner F. Immune processes in the pathogenesis of liver disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1965 Jun 30;124(2):781-99.

32- Desmet VJ. New aspects of piecemeal necrosis. In: Bianchi L, Gerok W, Popper H, eds. *Trends in hepatology*. Lancaster: MTP Press, 1985; pp 183-200

33- Bianchi L, De Groote J, Desmet V et al. Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet*, 1977; ii: 714-719

34- Kerr JFR, Cooksley WGE, Searle J et al. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet*, 1979; ii: 827-828

- 35-** Boyer JL, Klatskin G. Pattern of necrosis in acute viral hepatitis. Prognostic value of bridging (subacute hepatic necrosis). *N Engl J Med.* 1970 Nov 12;283(20):1063-71.
- 36-** Chen TJ, Liaw YF. The prognostic significance of bridging hepatic necrosis in chronic type B hepatitis: a histopathologic study. *Liver.* 1988 Feb;8(1):10-6.
- 37-** Bianchi L, De Groote J, Desmet V et al. Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet,* 1977; ii: 714-719
- 38-** Cooksley WG, Bradbear RA, Robinson W, Harrison M, Halliday JW, Powell LW, Ng HS, Seah CS, Okuda K, Scheuer PJ, et al. The prognosis of chronic active hepatitis without cirrhosis in relation to bridging necrosis. *Hepatology.* 1986 May-Jun;6(3):345-8.
- 39-** Combes B. The initial morphologic lesion in chronic hepatitis, important or unimportant? *Hepatology.* 1986 May-Jun;6(3):518-22.
- 40-** Thung SN, Gerber MA. The formation of elastic fibers in livers with massive hepatic necrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1982 Sep;106(9):468-9.
- 41-** Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L, Di Sario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver.* 1999 Jun;19(3):212-9.
- 42-** Liang YR, Cheng RX, Shen M, Guo YX, Su XS. A further study on capillary-like bile ductules proliferation in chronic active hepatitis. *Chin Med J (Engl).* 1990 Aug;103(8):623-8.

- 43-** Le Bail B, Faouzi S, Boussarie L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Extracellular matrix composition and integrin expression in early hepatocarcinogenesis in human cirrhotic liver. *J Pathol.* 1997 Mar;181(3):330-7.
- 44-** Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1223-30.
- 45-** Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1472-7. Review.
- 46-** Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. *Am J Med.* 1996 Jan;100(1):98-109.
- 47-** Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology.* 1996 Apr;23(4):909-16. Review.
- 48-** Rosenberg W. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut.* 1999 May;44(5):759-64. Review.
- 49-** Schaff Z, Kovalszky I, Nagy P, Zalatnai A, Jeney A, Lapis K. Human and experimental hepatocarcinogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1998;228:90-7. Review.
- 50-** Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia: more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology.* 1996 Aug;111(2):526-8.
- 51-** Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human

hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):361-7.

52- Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):135-42.

53- Bissell DM, Maher JJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis. In: Zakim D, Boyer TD, eds. *Hepatology: a textbook of liver disease*. W.B Saunders Co. Philadelphia, 1996: pp 506-525

54- Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*. 1995 Dec;19(12):1409-17.

55- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996 Aug;24(2):289-93.

56- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996 Aug;24(2):289-93.

57- Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol*. 1993 Feb;17(2):155-62.

58- MacSween RNM, Burt Ad, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP. Liver cirrhosis. In: Crawford JM, eds. *Pathology of The Liver*, 4th edn, Philadelphia: Elsevier Science, 2003; pp: 575-619.

- 59-** Gressner AM, Haarmann R. Regulation of hyaluronate synthesis in rat liver fat storing cell cultures by Kupffer cells. *J Hepatol.* 1988 Dec;7(3):310-8.
- 60-** Crawford AR, Lin XZ, Crawford JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology.* 1998 Aug;28(2):323-31.
- 61-** Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest.* 1989 Dec;84(6):1780-5.
- 62-** Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS. Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest.* 1990 Jun;85(6):1833-43.
- 63-** Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(1):1-11. Review.
- 64-** Basbaum CB, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct;8(5):731-8. Review.
- 65-** Friedman SL, Millward-Sadler GH, Arthur MJP. Liver fibrosis and cirrhosis. In: Millward-Sadler GH, Wright R, Arthur MJ eds. *Wrights liver and biliary disease*, 3rd edn, London: Saunders, 1992: pp 821-881

66- Arthur MJ. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Pathol Res Pract.* 1994 Oct;190(9-10):825-33. Review.

67- Ozen O, Krebs B, Hemmerlein B, Pekrun A, Kretzschmar H, Herms J. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 15;10(14):4746-53.

68- Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJ. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest.* 1992 Jul;90(1):282-7.

69- Reif S, Somech R, Brazovski E, Reich R, Belson A, Konikoff FM, Kessler A. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion.* 2005;71(2):124-30. Epub 2005 Mar 21.