

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

2023

2-ASETİLAMİDOFLUOREN İLE REJENERASYON
HALİNDEKİ SIÇAN KARACİĞERLERİNDE OLUŞTURULAN
LEZYONLARIN DENEYSEL HEMOSİDEROZİS İLE
GÖSTERİLMESİ ve BU LEZYONLARIN AGNOR YÖNTEMİ
İLE DEĞERLENDİRİLMESİ .

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serap IŞIKSOY /

ESKİŞEHİR - 1990

Anadolu Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Asistanlığım süresince bana eğitim veren
ve tez çalışmam sırasında fikirleri, önerileri
ve eleştirileri ile yardımcı olan hocalarım Prof.
Dr.Kemal BAYRI, Prof.Dr.Nilüfer TEL, Doç.Dr.Ülkü
ÖNER ve tez danışman hocam Doç.Dr.Özgül PAŞAOĞLU
na teşekkürlerimi sunarım.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa no.</u>
GİRİŞ	1
MATERYAL ve METOD	31
BULGULAR	38
TARTIŞMA	69
SONUÇLAR.	86
ÖZET	88
SUMMARY	89
KAYNAKLAR	90
EKLER	98

G İ R İ Ő

Hücrelerin neoplastik transformasyonu kimyasal karsinojenler, onkojenik virüsler ve ışın yayan enerjiler gibi pek çok etkenlerle in vitro olarak oluşturulabilmektedir. Bazı kimyasal maddelerin insanlarda da kanserojen etkisi olduğu belirlenmiştir. Yine bazı neoplazmların da virüslerle bağlantısının kanıtları gittikçe artmaktadır (1). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, insanlarda gelişen kanserlerin % 80-90 ının yaşama biçimi ve çevresel etkilere yani ekstrensek faktörlere bağlı olarak oluştuğunu göstermektedir (1-3).

Ekzojen karsinojen etkilerin bilinmesi, korunma çarelerinin aranması ve etkilerinden kaçınılmasına olanak sağladığından bu konudaki gözlemler ve epidemiyolojik çalışmalar önemlidir.

1761 de Dr.John Hill aşırı enfiye kullananlarda burunda polip şeklinde lezyonlar saptamıştır. 1775 de ise İngiliz cerrahi olan Sir Pervical Pott, çocuk yaşında baka temizleyiciliğine başlayan kimselerde skrotum kanserlerinin sık görüldüğünü gözlemlemiş ve bildirimde bulunmuştur. Burada isin ve kurumun etkisi ile skrotum kanserinin oluşabileceği düşünülerek katran ile çalışmalar yapılmıştır. 1915 de Yamagima ve Ichikama katranı

tavşan derisine defalarca sürerek buralarda karsinom meydana getirmişler ve bu suretle kimyasal uyarılar, tahrişlerle kanser oluşturmaya başlamışlardır. Ardından Kennaway ve Cook 2 ton ham kömür katranından 50 g kimyasal olarak saf karsinojen olan 3-4 benzyprene elde etmişlerdir. Bu öncül gözlemlerle polisiklik aromatik hidrokarbonların karsinojenik özellikleri kanıtlanmıştır. Bundan sonraki yıllarda yüzlerce kimyasal maddenin de hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda karsinojenik oldukları gösterilmiştir (1,3-5).

İnsanlarda tümör oluşumunda hiperplastik bir ortam zemin yaratır. Başlatıcı etkenin verilmesi ile tümörün oluşumu arasındaki latent periyod sırasında, kimyasal model sistemlerinde, "preneoplastik" olarak isimlendirilen, enzim yönünden de değişen odaklar tariflenmiştir ve hücre proliferasyonunun, bunların oluşturulmasında zorunlu olduğu düşünülmektedir (1).

Kimyasal karsinojenlerin kültürlerde ve in vivo şartlarda kanser oluşturmada gözlenen neoplastik transformasyon dinamik bir gelişmedir. Bu gelişme hücrelerin tipine, türlere, karsinojenin reaktivasyonuna veya metabolitlerine ve özellikle dozuna bağlı olarak gelişir, hücrelerin birbirini takibeden jenerasyonlarını da kapsar (1). Kimyasal nedenlerle oluşan neoplastik transformasyon çok basamaklı ve muhtemelen birden çok etki yapılarak oluşan, birbirini izleyen hücre soylarını da kapsamına alan, her biri daha çok malign fenotip özelliklerine yaklaşarak seyreden bir gelişmedir (1).

30 yılı aşkın bir süredir, sıçanlarda, hepatosellüler karsinom oluşturulmasında kimyasal karsinogenezis bir model olarak kullanılmaktadır (6). Deneysel hepatokarsi-

nogenezis ile ilgili olarak yapılan araştırmalar, karsinogen verilen sıçan karaciğerlerinde değişken şekilde görülebilen, histokimyasal yöntemlerle saptanabilen odaksal olarak gelişen lezyonlara ve bu odakların fenotipik özelliklerine yönelmiştir (7). Bu odaklar; karaciğer tümörü oluşumu ile bağlantılı ise, özelliklerinin bilinmesi neoplastik gelişimin öğelerine yönelik bilgiler kazanılmasına olanak sağlayacağından önemli olmaktadır (7).

Karaciğer tümörlerinin kemirici hayvanlarda deneysel olarak kimyasal karsinogenlerle oluşturulması sırasında görülen çeşitli hücresel lezyonlar, malign neoplazmların gelişiminde öncül olarak düşünülmektedir. Hepatosellüler karsinomun (HCC) prekürsörleri olabileceği düşünülen ve preneoplastik lezyonlar olarak adlandırılan bu lezyonlar; "oval hücre proliferasyonu", "altered foci (odaksal lezyonlar)" ve "neoplastik (hiperplastik) nodüller" dir (8-18).

Kimyasal karsinogenler, direk veya çoğu zaman olduğu gibi vücutta karsinogen etkiye sahip metabolitlere dönüşerek etki oluştururlar (19,20). Tümör oluşumunda, somatik mutasyon teorisi geniş ölçüde kabul edilmiş bir teoridir (1,19,21). Buna göre, tüm karsinogenik maddeler, DNA'nın primer hedef oluşu nedeniyle genetik kodda bazı değişikliklere ve hücrelerde mutasyonlara neden olmaktadır (1,19,20). Ayrıca karsinogenik etkinin belirgin hale gelmesinde DNA onarımının, etken tarafından engellenmesinin de katkısı olabilmektedir. Örneğin, karaciğerde karsinogenik etkisi olduğu bilinen etkenlerin DNA'da meydana gelen bozukluğun onarımını geciktirdikleri ve böylece mutasyonun kalıcı olmasını sağladıkları gösterilmiştir

(7,19). Diğer bir önemli nokta da kalıcı bir mutasyon oluşturulduktan sonra ikinci bir etken ile hücre proliferasyonunun sağlanmasıdır (19,21).

Rejenerasyon halindeki hücreler karsinogenik etkiye sahip olan maddelere karşı daha duyarlıdır (21). Hücre çoğalmasını stimüle eden etki ile hücreler hızla çoğalmaya başlar, bu sırada somatik mutasyon olasılığı da artar ve tümör oluşumu yönünde ilerleyici gelişmeler görülür (21).

Hastalık durumlarında nüve, DNA ve hücre kinetiklerinin değeri konusunda histopatologların ilgisi gittikçe artmaktadır (22).

Son yıllarda ribozomal RNA'nın kodlandığı bir kromozom segmenti olan ve hücrede protein sentezi, transkripsiyon işlevinde rol oynayan "nücleolar organizasyon bölgesi (NOR)" un gümüşleme tekniği ile histolojik ve sitolojik incelemelerde gümüş tutan alanlar biçiminde (AgNOR) gözlenebilmesi normal, hiperplastik, benign ve malign neoplastik hallerin ayırımında kullanılmasını gündeme getirmiş ve bu tekniğe olan ilgiyi arttırmıştır (22,23).

Bu çalışmada erkek sıçanlara uygulanan parsiyel hepatektomi sonrası verilen bir aromatik amin olan 2-Asetilamidofluoren ile oluşturulan, bir grupta deneysel hemosiderozise karşı olan direnç özelliğinden yararlanılarak da belirlenen preneoplastik karaciğer lezyonlarını incelemeyi ve bu lezyonlarda AgNOR yöntemi ile nükleolus yapısını ve nücleolar aktiviteyi gözlemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Karaciğer sıçanın en büyük organıdır, sıçanın türüne veya beslenme tipine göre ağırlığı değişim gösterir. Ancak iyi tanınan türlerde ve standart bir beslenme alanlarda vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığı arasında bir bağlantı vardır (24).

Karaciğer ağırlığı, vücut ağırlığına göre % şeklinde formüle edilmiştir. Örneğin, 300-350 g ağırlığındaki bir Wistar erkek sıçanın karaciğer ağırlığı, vücut ağırlığının % 2.65'idir (24).

Sıçan karaciğeri 3 derin fissür ile ayrılmış 4 lobdan ibarettir. Bu 4 lob vena kavayı çevreleyen bir parankimatöz eksen çevresinde birleşirler. Batına ksifopubik orta hat kesi ile girildiğinde orta ve sol lob ile karşılaşılır, bu iki lob ön loblardır. Bu iki lob, arka larında lokalize olan sağ lateral ve kaudat lobları örteler.

Median Lob: Trapezoidal şekile sahip olup, en önde yer alır. Umblikal fissür ile median lob, sol (lobun 1/3 ünü teşkil eder) ve sağ olarak 2 kısma ayrılır. Umblikal fissür falsiform ligamentin insersiyo yeridir.

Sol Lateral Lob: Kalın ve romboid şekildedir, kısmen median lob ile örtülür, kaudat lobun ventral kısmını tamamen örter ve hafifçe dorsal kısmına uzanır.

Sağ Lateral Lob: Frontal bir fissür ile iki eşit ön ve arka kısma ayrılır. Her biri piramidal şekildedir.

Kaudat Lob: Derin bir frontal fissürle ince quadrilateral kısma ayrılır (24).

Parsiyel hepatektomi, karaciğer rejenerasyonu çalışmalarında, en uygun deneysel modeldir (2). Ayrıca hepato karsinogenezis çalışmalarında, kimyasal ajanlarla birlikte, karsinogenezisi hızlandırmak amacıyla kullanılan metodlardan biridir (8). Kanseri yapıcı etkilerin hızlı proliferasyon olan hücreler üzerinde en büyük etkiyi gösterdiği de bilinmektedir (2,3,6). Karaciğerin preneoplastik lezyonlarına yönelik çalışmalarda generalize ve kuvvetli bir büyüme stimulusu sağlamak için 2/3 parsiyel hepatektomi kullanılmaktadır (26-29).

Kanser meydana getiren kimyasal maddelere ve diğer etkenlere karsinojen veya kanserojen adı verilmektedir (4,19). Kimyasal karsinojenlerin belirgin özellikleri:

1. Çok çeşitli yapıda olan, doğal ve sentetik ürünlerdir (3).

2. Bazıları direkt etki gösterirler, örneğin, alkileyici ve arilleyici maddeler, N-hidroksilli maddeler ve epoksidler gibi (19). Bunların karsinojenik etki göstermemeleri için kimyasal bir dönüşüm gerekmemektedir. Ön karsinojen olarak da adlandırılan diğerleri ise indirekt etki gösterirler ve sadece metabolik değişim sonrası ak-

tifleşirler (1,19,21).

3. Tüm kimyasal karsinojenler, oldukça reaktif, elektrofıl maddelerdir, yani elektrondan yoksun atomlara sahiptirler. Bunlar, elektrondan zengin RNA, hücresel proteinler ve esasen DNA daki atomlar ile reaksiyona girerler (1,5,19).

4. Özellikle, zayıf karsinojenler olmak üzere, bazı kimyasal maddelerin karsinojenik etkileri, az oranda kanseröz bir aktiviteye sahip olabilen ve geliştirici (promotor) denilen ajanlarla oluşturulur. Ancak kuvvetli karsinojenlerin bu geliştirici maddelere gereksinimleri yoktur (3).

5. Kuvvetli karsinojenlerin DNA üzerindeki değiştirici etkileri, kalıcı ve irreverzibldir (3,4,21). Ancak geliştirici olanların etkisi reverzibldir ve epigenetik mekanizmayı ilgilendirir görünümündedir (3,19,21).

6. Çeşitli kimyasal karsinojenler, virüsler veya radyasyon gibi diğer karsinojenik etkilerle birlikte neoplazi oluşturmada rol oynarlar. Promosyon sağlayan bu maddelere kokarsinojen, olaya ise kokarsinogenezis denir (3,20).

Direk etki eden karsinojenler genellikle zayıf karsinojenlerdir, etkileri zaman ve doza bağlıdır (1,3). DNA hasarına neden olarak, karsinojenik olma eğilimi gösterirler (1).

Metabolik aktivasyon gereken ön karsinojenler (prokarsinojen): Bu gruba giren maddeler 4 grupta toplanmıştır (1,3):

1. Polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbonlar: benz(a)antrasen, benzo(a)piren vs.

2. Aromatik aminler, amidler ve azo boyaları: 2-naftilamin, benzidin, 2-asetilamidofluoren (2-AAF) dimetil aminoazobenzen .

3. Mikrobiyolojik ürünler ve doğal bitkiler: Aflatoksin B₁, griseofulvin .

4. Diğerleri: Nitrozamin ve amidler, vinilklorid, nikel, krom, insektisitler, fungusitler vs.

Kimyasal karsinogenezisde, etkenin özellikleri yanı sıra, konakçının durumu da karsinogenezisi etkiler. Konakçı ile ilgili özellikler şu şekildedir:

1. Tür ve Metabolizma Kalıbı: Karsinojenik etkinin türe göre değişimi, etkenin ön-karsinojen olması ve bazı türlerde aktif şekle dönüşmesinin mümkün olup olmaması veya maddenin metabolizma kalıbının türe göre değişmesi ile ilgilidir. Bunun tipik bir örneği 2-AAF dır. Bu madde sıçan, fare, tavşan vs. de karsinojen olduğu halde kobayda değildir.

2-AAF bir aril amin olup, ön karsinojendir. Karsinojenik etkisi mikrozomal monooksijenaz enzimi ile oluşturulan ve minör bir metaboliti olan N-hidroksi AAF oluşumuna bağlıdır (19,30). N-hidroksi ürünleri elektrofilik olup, serbest durumda iken ve makromolekülleri alkilleyerek karsinojenik etki gösterirler (19). Son zamanlar da hepatosit nüvesinin mikrozomal sistemine benzer bir monooksijenaz sistemine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu monooksijenaz sistemi, mikrozomal sistemden bağımsız görünümündedir. Yapılan bir çalışmada, hepatosit nüvesinin 2-AAF yi mutajen etki yönünde aktive etme yeteneğine

sahip olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (30).

N-hidroksi AAF, karaciğerde glukronik asitle konjuge edilmek suretiyle böbreklerden itrah edilir. Kobay karaciğerlerinde N-hidroksillenme yapan enzim bulunmadığından 2-AAF böyle bir etki yapmamaktadır. 2-AAF idrarla itrah edildikten sonra mesanede idrar içersindeki B-glukronidaz enzimi ile hidrolize olur ve burda N-hidroksi-AAF oluşumu ile bazı türlerde mesanede karsinogen etki gösterir (19).

2. Genetik Predispozisyon: Belirli hayvan türünün belirli ırkları, gerek kimyasal karsinogeneze, gerekse spontan kansere daha fazla eğilim gösterirler (19).

3. Doz: Deney hayvanlarında yapılan incelemeler, karsinogenik etkinin doza bağımlı olduğunu göstermiştir.

4. Cins: Karsinogenliğin sekse bağılı olarak değişimi, karsinogenik maddenin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu yapan bazı enzimlerin etkinliğinin, seks hormonlarına bağımlı olmasından ileri gelebilir. Örneğin, aromatik amin yapılı karsinogenlerin aktif şekle dönüşümünü sağlayan sülfotransferaz enzimi, erkek hayvanların karaciğerlerinde, dişilerinkinden daha yüksek düzeyde bulunur (19).

5. Yaş: Yeni doğmuş deney hayvanları, genellikle karsinogenlere erişkin hayvanlardan daha duyarlıdırlar. Yeni doğan farelerde aflatoksin, hepatoma oluşturduğu halde, erişkin farede bu etkisi görülmez (19).

6. Beslenme: Afrika'da karaciğer karsinomunun daha sık görülmesi, besinlerin *Aspergillus flavus* mantarı tok-

sinlerinin bulaşması ile ilgili görülmektedir. Bu mantar dan çıkan aflatoksin, organizmada "son karsinojen" oluşumuna neden olur (2). Ayrıca diyet içersinde var olan mikotoksinler, peptisid kalıntıları ve diğer faktörler de ilaca bağlı kanser sıklığını değiştirmektedir (19).

7. Coğrafik Koşullar: İklim koşulları, çevre ile ilgili diğer faktörler tümör gelişmesinde önem taşımaktadır. Örneğin, Afrika'da ve Japonya'da karaciğer kar sinomu sıktır. Kuzey Amerika ve Avrupa'da seyrek tir (2, 5).

8. İmmünolojik faktörler:

Bir kaç direk etki gösteren karsinojenler bir tara fa bırakılırsa, kuvvetli kimyasal etkenlerin çoğu "son karsinojen" olmak üzere metabolik dönüşüm gerekti ren ön karsinojendir (1). Karaciğer, metabolik aktivas yon ve detoksifikasyon yönünden önemli bir organdır (1, 19). Bu fonksiyonları görebilme yeteneği, aynı mikrozo mal sistemlerle detoksifiye edilen bazı ilaçlarca ya da Yaş, hormonlar ve beslenme gibi faktörlerce, enzim sis temleri aracılığı ile etkilenebilmekte, dolayısı ile ön karsinojenlerin aktivasyon ve detoksifikasyon dereceleri değişiklik gösterebilmektedir. Bir kimyasal maddenin kar sinojenik etkisi bu dengeye bağlı olup, bunu istenilen yönde değiştirebilmenin yolu bulunamamıştır (1).

KİMYASAL KARSİNOJENLERİN ETKİ MEKANİZMALARI

1. Kimyasal karsinojenlerin büyük çoğunluğu muta jendir (3,21). Direk etki gösteren karsinojenik bileşik ler, elektrofilik özellikleri nedeniyle, hücre DNA sının

spesifik yerlerine kovalent bağla bağlanırlar. Benzer olarak ön-karsinojenler de konakçı tarafından eletrofilik metabolitlere döndürüldükten sonra hücre DNA sına kovalent olarak bağlanma yeteneğine sahip olurlar (3,5). DNA nın tüm karsinojenik kimyasal maddeler veya onların son metabolitleri için birincil hedef oluşu nedeniyle, genetik koddaki bazı değişikliklerin (buna geniş anlamda "somatik mutasyon" denilmektedir) tümör yönündeki gelişimde önemli olduğu düşünülmektedir (1,5,21).

Her bir karsinojen DNA ile spesifik bir şekilde etkileşir, örneğin alkilleyici ajanlar guanini 0-6 pozisyonunda etkilerse, kuvvetli şekilde mutajenik ve beraberinde karsinojeniktir (1). Normal hücreler kimyasal olarak transformasyon gösteren hücrelerden, DNA dan, DNA rekombinasyonu yolu ile gen transferi yapılarak kanser hücrelerine dönüştürülebilir. Bu da DNA nın primer hedef olduğunu desteklemektedir (1). Bir kimyasal karsinojen, ayrıca hücre RNA sına bağlanabilir ve onu değiştirebilir. Değiştirilen RNA, hücre DNA sına kopya edilir ve bu da reverz transkriptaz sistemi ile oluşur. Sonuçta, kalıcı ve yanlış bilgi yerleşerek bir kimyasal karsinojen mRNA veya tRNA yı değiştirebilir. Böylece aberran proteinler oluşabildiği gibi ayrıca karsinojen, önceden var olan bir proteine bağlanarak da direk olarak onu değiştirebilmektedir. Eğer ki değişen protein DNA polimeraz gibi bir enzim ise hatalı DNA replikasyonu oluşacaktır. Diğer taraftan, eğer değişen protein, konağın regülatör genlerini kontrol eden represör bir protein ise, onun modifikasyonu sabit bir epigenetik değişikliğe neden olacaktır (5,21).

2. Kimyasal etkenlerin karsinogenik etkileri doza bağımlıdır. Belirli bir zaman içerisinde tekrarlayan dozlar şeklinde veya uygun tek bir dozda verilmesi ile aynı sonuç elde edilir (3). Doku ya da hücrelerin uygun bir dozda karsinogenik etkene maruz kalmaları sonucu başlangıç değişiklikleri oluşur, buna "inisiyasyon aşaması" denir. Oluşan bu değişiklik kalıcıdır ve tümöre gelişim eğilimi içersindedir (1,3,5,19,21). İnisiyasyon fazında oluşan değişiklikler tek başına tümör oluşumu için yeterli değildir. En azından bir siklus hücre replikasyonu, biyokimyasal lezyonu tamamlamış olmalıdır (1). Yani başlangıç aşaması (inisiyasyon) bu nedenle en azından iki basamaklı bir olaydır (1). Bu değişiklik mikroskopta görülmeyebilir. İnisiyasyon yapan etkenlerin çoğu mutasyon yapar ve heredite ile ilgili olduğu düşünülmektedir (5, 21).

3. Kimyasal etkenlerin karsinogenik etkileri, geliştirici (promotor) etkenlerin uygulanması ile önemli derecelerde arttırılabilir (5). Geliştirici (promotor) maddeler hücre replikasyonu oluşturarak, inisiyatör maddelerle oluşturulan mutasyon sonucu normalden sapmış olan hücre klon veya klonlarının, sabit bir şekilde ve kalıcı olarak transformasyon döneminde kalmalarını sağlar. Bu dönemde hücre klonlarında daha çok genetik hatalar gelişir, Genomunda anormallikleri bulunan hücreler, başlatıcı ve geliştirici etkenlerin etkilerine açıktır (3).

Normal hücreler, in vitro olarak karsinogenik etkenlere maruz bırakıldığında, sonradan gelişen ve kansere benzediği düşünülen pek çok fenotipik değişiklikler göz-

termektedir ve bu nedenle bir transformasyona uğradıkları söylenilmektedir. Bu transformasyon, uygun bir konakçıda oluşmakta, sadece bir safhada gelişmemekte ve tümör gelişiminin başlangıcını oluşturmaktadır (3).

Transformasyonun fenotipik olarak belirtileri şu şekilde sıralanabilir:

1. Değişen büyüme özellikleri.
2. Morfolojik değişiklikler.
3. Karyotip değişiklikleri.
4. Antijenik değişiklikler.
5. Metabolik sapmalar.
6. Değişen yüzey özellikleri.

1. Büyüme Özelliklerindeki Değişiklikler: Transformasyon gösteren hücrelerde kontakt inhibisyon kaybolur ve kültürlerde düzensiz kitleler ve üstüste gelecek yığınlar yapar (3,21). Sürekli çoğalma kapasitesine sahiptirler.

2. Morfolojik Değişiklikler: Bunlar var olduğunda güvenilir olmamakla birlikte neoplastik transformasyonu gösterir, ancak olmayışı da böyle bir transformasyonun varlığını ekarte ettirmez (3).

3. Karyotip Değişiklikleri: Bilindiği gibi karyotip değişiklikleri önemli mutasyonel olaylar söz konusu ise oluşmaktadır. Bu tip değişiklikler, transformasyon gösteren hücreler ve kanser hücrelerinin çoğunda tanımlanmıştır ve muhtemelen tümünde gen değişiklik-

leri söz konusudur. Bunlar, kromozom sayılarında anormallikler ve spesifik kromozomlarda translokasyon ve delesyon şeklindeki değişikliklerdir (3,21).

Kromozom sayıları ile ilgili olarak tümörler; anoploidi, hipoploidi ve öploidi gösterir. Çoğunda anoploidi görülür (21).

4. Antijenik Değişiklikler: İnsanlarda, kanser hücrelerinin normal hücrelerdekilere farklı yapıda antijenler taşıyıp taşımadıkları ve bunların konakçının immün sistemi tarafından tanınıp tanınmadıkları konusu tartışmalıdır. Bu konu ile ilgili tartışmalar hayvan model sistemlerindeki sonuçlara dayanmakta olup, aşağıdaki şekilde genellemeler yapılabilir (3):

a) Hayvanlarda onkojenik virüsler ve kimyasal karsinojenlerle oluşturulan kanserler, immün cevabı uyaran tümör antijenlerine sahiptirler.

b) Hayvanlarda spontan olarak gelişen tümörler, zayıf bir immün cevap oluştururlar. Bu oldukça spesifik monoklonal antikörler kullanılarak gösterilebilir.

c) İnsanlarda bazı kanserlerin, savunma reaksiyonunu uyandırdığına dair ipuçları vardır ancak, bunların spesifik bir immün cevap olup olmadıkları konusu açık değildir.

d) İnsanlarda gösterilen bu savunma mekanizması tümörle ilgili antijenler tarafından başlatılıyor olabilir.

e) İnsan kanserlerinin tek bir tümöre spesifik

antijene sahip olduklarına dair kesin bir kanıt yoktur.

Kimyasal olarak oluşturulan tümörler özel antijenler gösterir, aynı hayvanda aynı kimyasal nedenle oluşan diğer tümörlerde gözlenen antijenler farklıdır. Virüslerle oluşan tümörlerde ise aynı virüsle oluşan tümörlerde antijenik özellikler aynıdır (3).

5. Metabolik Değişiklikler: Deneysel olarak transformasyon ve de insan kanser hücrelerinde normalden sapan pek çok değişiklik tariflenmiştir. Ancak bu değişikliklerin hiçbirinin kanser fenotipinin ortaya çıkışından sorumlu temel olaylar olmadığı düşünülmektedir (1,3). Değişik tümörlerde olduğu söylenen "biyokimyasal yaklaşım" ın da kanserin doğası ile ilgili bir görüş getiremeyeceği belirtilmektedir (3).

6. Hücre Yüzey ve Membran Değişiklikleri: Konakçının hücre yüzey antijenleri ve plazma membranının biyokimyasal yapısında değişiklikler olduğu tanımlanmıştır (1,3, 21). Hücrenin yüzeyindeki değişiklikler ile nüve değişikliklerinin ilgisi bulunmaktadır (21).

Malign tümörlerin gelişimi ile ilgili hücresel değişiklikleri tanımlamak için, pek çok araştırmacı, hedef organlar üzerinde karsinogen maddelerin malign tümör oluşumundan uzun zaman önceki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmaların bu düzeyinde olan problem her bir karsinogenik sistemde premalign olan hücre popülasyonunu tanıyabilme güçlüğüdür (31).

Preneoplazi terimi, benign ve malign neoplazmların öndönemini içerir (32). Neoplazmların gelişiminin öncesinde bulunan ve neoplazmların geliştiği hücresel popülasyo-

nu tanımlamak üzere kullanılmaktadır (8). Preneoplazi, prekansere eş değildir. Histolojik düzeyde ise preneoplastik lezyonlar; neoplastik yapısı olmayan, fenotipik olarak değişen hücre popülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Son dönemlerde elde edilen bulgular belirli tipte tümörlerin oluşumunda öncül olan fokal lezyonların gerçekten fenotipik olarak değişen preneoplastik hücreleri içerdiğini göstermektedir (32).

Bir neoplazinin gelişimi, sıklıkla ve de özellikle fokal hiperplazi gibi doku değişikliklerinin öncüllüğü ile oluşmaktadır (13,16,32,33).

Hiperplazi, bir doku ya da organdaki hücrelerin sayısındaki artıştır. Hiperplazinin şiddetine bağlı olarak neoplazinin gelişebileceği odaklar oluşabilmektedir. Kanser yapıcı etkilerin, hızlı proliferasyon olan hücreler üzerinde en büyük etkiyi gösterdiği de bilinmektedir (3,21).

Deneyisel hayvan çalışmalarında da hiperplazi, karaciğer karsinomunun öncülü gibi görünmektedir. Hayvanlarda karsinojen bir madde ile beslenme sonucu hiperplaziden neoplaziye yavaş yavaş gelişen bir dönüşüm olabileceği belirtilmektedir (16).

Hepatokarsinojenlerin sıçanlara verilmesi ile karaciğerde küçük fokal lezyonlar oluştuğu gözlenmiştir. Bu lezyonlara Reuber isimli araştırmacı "hiperplastik odaklar" adını vermiştir (16). Devamlı karsinojen verimi ile yaklaşık 1 mm çapında lezyonlar oluşmuş ve bunlara da "hiperplastik alanlar" denilmiştir (6). Bu lezyonların hiperplazi gibi gerçek bir aşırı büyüme olup olmadığının açıklanması gereklidir. Çünkü bu lezyonlar konusundaki yaklaşım farklı olup, bazı yazarlarca proliferatif olmadık-

larının kanıtları sunulurken, bir kısım araştırmacı ise bunların fokal aşırı proliferatif büyümeler olduklarını düşünmektedir (13). Williams ve Watanabe isimli araştırmacılar da bu lezyonların hiperplastik olduğunu öne sürmüşlerdir (11).

Karaciğerde, preneoplastik lezyonların naturü ve isimlendirilmesi konusunda bir fikir birliği oluşturmak üzere Uluslararası Kansere Enstitüsünün 1974 yılında yaptığı toplantıda sıçanlarda hepatosellüler tümörler ve ilişkili lezyonlar şu şekilde sınıflanmıştır (34):

1. Hücresel değişim odakları
 - a) Clear hücre odakları
 - b) Eozinofilik veya buzlu cam görünümlü odaklar
 - c) Bazofilik odaklar
 - d) Mikst hücre odakları
2. Neoplastik nodüller
3. Hepatosellüler karsinomlar
 - a) İyi diferansiye
 - b) Orta derecede diferansiye
 - c) Kötü diferansiye
 - d) Glandüler ve/veya papiller formasyonu olan
4. Kolanjiofibrozis

HÜCRESEL DEĞİŞİKLİK GÖSTEREN ODAK VEYA ALANLAR:

Bu toplantıda odak veya alan teriminin seçimi patoloğun kararına bırakılmakla birlikte odak teriminin bir

karaciğer lobulünden daha küçük lezyonlar, alan teriminin ise bir lobül boyutunda veya daha büyük olan lezyonlar için kullanılması önerilmiştir. Lezyonlarda gözlenen primer değişiklikler, hepatositlerin sitoplazmalarının boyanma özellikleri ve yapısal görünümüne dayalı olduğundan tamamen tanımlayıcı terimler öne sürülmüştür. Bu lezyonlarda, karaciğerin yapısında açıkça görülebilen bir bozukluk söz konusu olmayıp, etkilenen hücreler karaciğer dokusundan sınırlı değildir ve içinde yer alırlar. Bu hücreler normal hepatositlerden daha büyük veya küçüktürler. Bazılarının nüveleri büyümüş, veziküler ve büyük nükleoluslu olabilir (34). Bu odaklarda hemotoksilen eozin boyası ile 4 farklı tipte hepatosit görülmüştür (14).

CLEAR HÜCRELER: Bu hücreler genellikle normal hepatosit boyutunda olup, bazen daha büyüktür (34). Aşırı miktarda glikojen depolarlar ve bu özellikleri sitokimyasal olarak Periodic Acid Schiff reaksiyonu veya Best's Carmine boyası ile gösterilebilir. Elektron mikroskobu ile depo edilen glikojen, esas olarak sitoplazmik matriks içinde α veya β parçacıkları şeklinde bulunur. Bannasch, sitoplazmada biriken glikojen yapısında farklılık görmemiştir, ancak Drochmans ve Scherer'in glikojen partiküllerinin de boyut yönünden büyük farklılıklar olduğuna dair kanıtlarının olduğunu bildirmektedir (14). Bazen depo edilmiş glikojen, büyük otofajik vakuollerden serbestleşerek, lizozomal parçalanma sonucu ince granüller şeklinde görülür. Granüler endoplazmik retikulum, çoğunlukla hücrenin periferik veya paranükleer alanlarına itilir ve sitoplazmanın her biriminde azalmış olarak görülür. Bu yer değişimine ve granüler retikulumun nisbi olarak azalmasına rağmen,

organelin ince yapısı hemen tamamen değişmemiş olarak kalır (14).

ASİDOFİLİK HÜCRELER: Bu hücreler, sitoplazmalarında ki artışa bağlı olarak genellikle büyümüşlerdir (34). Işık mikroskobundaki karakteristik asidofilik veya buzlu cam görünümü, agranüler endoplazmik retikulumdaki (ER) hipertrofiye bağlıdır, ki bu özelliği, sıklıkla, önemli derecede glikojen birikimi ile bir aradadır. Genellikle prolifer düz membranlar ile glikojen partikülleri arasında yakın bir ilişki vardır. Düz membranlar, çoğu vak'ada tipik bir düzen göstermelerine rağmen, glikojen içersin ya da içermesin genellikle konsantrik lamellöz kompleksler şeklindedir. Bu tanımlanmış yapılar [bunlara parmak izi (finger-trips) denilmektedir] agranüler ER hipertrofisinin morfolojik bir şekli gibi görünmektedir. Işık mikroskobunda bunlar girdap benzeri asidofilik şekiller olarak görülebilir (14).

BAZOFİLİK HÜCRELER: Diffüz sitoplazmik bazofiliye sahiptirler, normal karaciğer hücrelerinden daha büyük ve ya küçük olabilirler (34). Bu hücreler, daima glikojen, yağ veya agranüler ER dan fakirdir, ya da tamamen yoksundur. Işık mikroskobunda gözlenen sitoplazmik bazofilinin elektron mikroskobunda karşılığı serbest ya da membranlara bağlı olan ribozomların artışı şeklindedir.

Literatürde yukarda tanımlanmış hücrelerden başka tipte hücreler de tariflenmiştir. Bunlar:

VAKUOLLÜ HÜCRELER: Bunlar lipid damlacıkları içerirler. Kural olarak bu damlacıklar, sitoplazmik matriks içe-

risindedir, ancak bazen bu damlacıklar ER nin sisternalarında oluşur. Sıklıkla intranükleer yağ inklüzyonları görülebilir. Bazı vakuollü hücreler, yağ ilaveten glikojen içerirler. Bu hücrelerin çoğu glikojenden fakir olup, ribozom yönünden nisbeten zengindir (14).

INTERMEDIATE HÜCRELER: Yukarda tanımlanan hücre tiplerine ilaveten çeşitli yapıda hücreler tariflenmiştir. Işık mikroskobunda dikkatli bir inceleme ile saptanabilir. Sitoplazmaları şeffaf hücrelerinkine benzer, ancak şeffaf sitoplazmik alanlar noktasal bazofili, daha belirgin olarak da asidofilik, gevşek bir ağ içerirler. Büyük glikojen alanları ER un kıvrımları boyuncadır. Bu ER, genellikle ribozom içermektedir. Ribozomlar, ER un sisternalarının girintilerinde yerleşirler, membrana bağlı ribozomlara ilaveten ergostoplazma paketleri de, serbest ribozom içerirler. Ancak glikojen partikülleri nadirdir veya tamamen yoktur. Sitoplazma içersindeki bu küçük paketler, bazofilik görünümlü hücrelerde karakteristik olarak tüm sitoplazmayı kaplar. Bazen daha büyük miktarlarda tipik agranüler ve atipik granüler komponentlerin karışımı gözlenebilir (14).

NEOPLASTİK NODÜLLER: Bu tanımlama hiperplastik nodül deyimi yerine önerilmiştir (34). Nodüller, genellikle karsinogenezisin geç döneminde, odaksal lezyonlardan gelişir (11,13,16). Uzun yıllar hiperplastik oldukları düşünülmüş ve karsinomun prekürsörü olabileceği öne sürülmüştür. Nodüllerin karsinojen verilmesi durdurulduktan sonra gerilemeleri özelliğine dayalı olarak hiperplastik oldukları düşünülmüştür (8).

Kronik olarak karsinojen verilen modellerde veya

karsinojen kesilmesinden sonra gelişen nodüllerin natürü oldukça farklıdır. Sıçanlarda böyle nodüller kalıcı olup ilerleyici olarak gelişir (35). Nodüllerin büyüme yeteneği sınırlıdır, çünkü bunların transplantasyon çalışmalarında progresif bir büyüme göstermedikleri gözlenmiştir (8,9). Ancak bazı otörler de tipik görünümlü nodüllerin metastaz yapmaları nedeniyle bu lezyonların neoplastik olarak tanımlanmasını ve bunlara adenom denilmesini önermektedirler (8).

Histolojik olarak nodüller genellikle birden çok karaciğer lobülü ölçüsündeki boyutta bir alanı işgal eden sferik lezyonlardır. İçersinde normal karaciğer yapısı yoktur. Hepatositler odaksal lezyonlardakilere benzer ve hücrelerdeki sitoplazmik değişikliklerin karışımı görülebilir. Bazen mitozlar ve değişen derecelerde nüvelerde büyüme, hiperkromazi, birden çok nüveye sahip olma ve büyümüş nükleolus gibi atipi özellikleri gösterebilir. Hücreler solid ve yığınlar halinde veya bir ya da birden çok sıralı hücre içeren irregüler kordonlar şeklinde bir yapı oluştururlar. Sinüzoidler, büyüyen hepatositler nedeniyle basıya uğrar veya değişen derecelerde dilatasyon gösterebilirler. Genellikle içerisinde portal alan yoktur. Önemli bir özelliği en azından periferinde bir alanı olmak üzere çevre karaciğer dokusundan keskin sınırlıdır ve yapısal bozukluk oluşturur (34).

Nodüler lezyonlar daha eski yıllarda A tipi ve B tipi olarak tanımlanmıştır. İyi diferansiye olmuş nodüllere A tip, hücresel displazi gösterenlere ise B tip denilmiştir. Son yıllarda B tipi nodüllerin karsinom oldukları düşünülmektedir. Williams ve ark. A tipi nodüllerin transplante edilebilir olduğunu göstermişler, hatta A tipi

nodüllerin karsinomunkilere benzer fenotipik değişikliklere sahip oldukları öne sürülmüştür (8). Bazofilik hücre içeren nodüllerin ise karsinom oldukları söylenebilir denilmektedir (14).

2-AAF verilerek oluşturulan nodüllerin de HCC'un geliştiği heterojen bir hepatosit popülasyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak çoğunda malign tümör oluşmaz. Genellikle 1 veya 2 nodülde HCC gelişmektedir. Bir çalışmada alınan sonuçlara göre sıçan tarafından alınan karsinogen miktarı ile oluşan HCC insidansı arasında bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur (31).

Preneoplastik lezyonlar içersinde yer alan diğer bir lezyon oval hücre proliferasyonudur (8).

Deneyssel kimyasal hepatokarsinogenezisde tartışılan gelen konulardan biri de oval hücreler ile HCC'nin histogenezis arasındaki bağlantıdır. Oval hücrelerin bazı HCC'lerde progenitor hücreler oldukları ileri sürülmüştür. Bu hücrelerin terminal safra duktus hücrelerinin proliferasyonundan geliştiğine inanılmaktadır (15). Ming-Saund Tsao ve ark. kültür çalışmalarında safra kanalı hücreleri, karaciğer epitel hücreleri ve oval hücrelerin biyokimyasal ve/veya ultrastrüktürel fenotiplerinin hemen hemen aynı olduğunu göstermiştir. Bunlara dayalı olarak kuvvetli bir ilişkinin var olduğu düşünülmüştür (15).

Bir çalışmada Indeed ve Inaoka'nın 3'methyl-4 (dimethylamino)azobenzen vererek oluşturduğu "oval" hücrelerin hepatositlere dönüşebildiğini gösterdikleri, ancak Tatematsu ve ark. nın 2-AAF ile beslenen sıçanlarda bunu gözlemedikleri bildirilmektedir (15). Yine çeşitli karsi-

nojen maddelerle (2-AAF, ethionin, N-nitrozomorfolin içeren ve kolinden yoksun diyetle beslenen sıçanlarda) yapılan çalışmalarda α -feto protein sentezinin tranzisyonel veya oval hücrelerde lokalize olduğu gösterilmiştir (6, 15).

Oval hücreler, karsinojen verilmesinden bir kaç gün sonra ortaya çıkabilen soluk nüveli, stoplazmaları dar ve küçük, oval formda hücrelerdir. Genellikle periportal alanlarda görülürler (8,36).

ODAKSAL LEZYONLARIN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

Odaksal lezyonlarda bir takım fenotipik değişiklikler tanımlanmıştır. Bunların görünümü değişik tipteki odaklarda farklı olabildiği gibi, aynı tip odaklarda da farklıdır.

1. Histokimyasal enzim markerları (gösterge araçları): Odaklar bir takım enzim anormallikleri ortaya koymaktadır. Örneğin, Glukoz-6-fosfotaz ve ATP-az aktivitesinde azalma, γ -Glutamyl transpeptidaz (GGT), epoksid hidraz, UDP-glukroniltransferazın fetal formu, nonspesifik esterase ve L-1 gibi enzimlerin aktivitesinde artma ve aldehid dehidrogenaz ve glutatyon transferazın plasental (GST-P) formu vb. normalde olmayan enzimlerin ortaya çıkışı gibi (8,28). GST-A, özellikle GST-P ve tüm bu enzimler preneoplazinin önemli gösterge araçlarıdır.

Hepatik GST enzimleri, bir grup ve birden çok fonksiyonu olan, detoksifikasyon ile ilgili proteinlerdir ve kimyasal hepatokarsinogenezisde önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Sitozolde yer alırlar ve elektrofilik

bileşimlerin detoksifikasyon reaksiyonlarına katılırlar. Belirli formlarının, özellikle de ligandinin kimyasal kar-sinojenler ile etkileştiği düşünülmektedir (28).

2. Glikojen: Bannasch (1968) ilk kez nitrozamin ile oluşturulan odakların aşırı glikojen depolanması göster-diğini ortaya koymuştur (8). Bu hepatokarsinogenezisin erken dönemine yönelik çalışmalar için bir dönüm noktası olmuş, beraberinde histokimyasal metodlar ile bu odaklar da mikrozomal bir enzim olan glukoz-6-fosfatazın aktivi-tesinde azalma olduğu gösterilmiştir.

N-nitrozomorpholin ile yapılan kısa periyodlu veya devamlı karsinojen verilen sıçanlarda, bir seri deneyler-de yapılan ışık ve elektron mikroskobu incelemelerinde, clear ve asidofilik sitoplazmalı aşırı glikojen depolayan hepatositlerden, glikojenden fakir bazofilik hepatoma hücrelerini içerir şekilde gelişen hücresel değişiklikler tanımlanmıştır. Preneoplastik clear ve asidofilik görünüm lü glikojen depolayan hücreler, karsinojen verimi kesil-dikten sonra kalıcı odaklar oluşturur. Intermediate, mikst ve bazofilik hücre odakları neoplastik nodüllere (adenom) ve hepatosellüler karsinoma gelişme gösterirler. Bu geli-şimin seyri, sıçanlarda birçok kimyasal maddelerle oluş-turulan hepatokarsinogenezis sırasında da gözlenmiştir.

Son yıllarda odaksal lezyonlar neoplastik nodüller-den ayırdedilmiş ve spesifik hepatosellüler lezyonlar için daha komplike bir nomenklatür sunulmuştur (32).

Aşağıdaki tabloda yer alan tigroid hücre odağı, ba-zofilik odağın bir tipi olup, bazofilik odaktan pek çok yönden farklılıklar gösterir (32).

Odaksal lezyonların sınıflaması ve morfolojik değişiklikler.

<u>Odak tipi</u>	<u>Glikojen</u>	<u>SER</u>	<u>RER</u>	<u>Mitoz</u>
Clear hücreli odak	+++	+	+	+
Asidofilik hücreli odak	+++	++(+)	+	+
Intermediate hücreli odak	++	+(+)	++(+)	++(+)
Tigroid hücreli odak	(+)	+(+)	++(+)	++(+)
Bazofilik hücreli odak	-	-	+++	+++
Mikst hücreli odak	mikst	mikst	mikst	mikst

SER: Düz endoplazmik retikulum.

RER: Ribozom taşıyan endoplazmik retikulum.

3. Deneysel hemosiderozise karşı oluşan direnç: Pek çok çalışmada dietle veya parenteral olarak demir yüklemesi yapıldığında odaksal lezyonlardaki karaciğer hücrelerinde demir birikiminde yetersizlik olduğu görülmüştür (8,9,11,13,35,36). Bu özellik oldukça duyarlı bir histopatolojik gösterge aracı olup, hepato-karsinogenezis ile ilgili kantitatif çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır. Yoğunluk gradienti üzerinde yapılan çalışmalarda da odaksal lezyondaki hücrelerin demir dansitesindeki farklılığın ortaya konulmasında kullanılabilen tek gösterge aracıdır (8).

4. α -Fetoprotein: 1963 de Abelev adult farelerde karaciğer kanserinde serumda fetal bir protein (AFP) in ortaya çıktığını göstermiştir. Daha sonra bu proteinin insan ve sıçan HCC larında yapıldığı ortaya konulmuştur. AFP, fetal ve neonatal sıçanların karaciğerleri

ve çoğu HCC tarafından yapılan bir serum proteini^{dir}. HCC oluşumundan uzun zaman önce ve de tümör oluşumuna sebep olamayacak kadar düşük dozların alınması sonucu da sentez edilebilir (6,8). Karsinojen çekildiğinde AFP nin azaldığı, karaciğer neoplazmı geliştiğinde tekrar arttığı gözlenmiştir (9). Böylece, AFP nin serumda artışı hepatokarsinogenezisde bir belirti olarak kullanılabılır ve insanlarda da kontrol edilebilen bir kaç özelli^{lik}ten biridir (8).

5. Sitotoksositeye Direncin Olması: Alexander Haddow karsinogenezis sırasında selektif bir sitotoksitenin rezistan bir hücre populasyonu oluşumuna neden olduğunu ileri sürmüştür (39). Diğer bir görüş de erken lezyondaki hücrelerin yeni özellikler kazanmış ve temel değişiklikleri olan hücrelerden gelişmiş olabileceğidir. Bu özelliklerden biri de karsinogene karşı gelişmiş direnci olabilir (13). Bu görüşe dayalı olarak erken lezyonlar da ortaya çıkan hücreler mutasyon veya indüksiyonla yeni ve sabit bir diferansiyasyon durumuna doğru değiştirilmiş olabilir, her iki görüş de mümkün ve kabul edilebilir olasılıklar olarak düşünülmektedir (13).

Erken ve hiperplastik lezyonlarda indükleyen karsinogenin mitotik inhibitör etkisine karşı direncin olduğu da ortaya konmuştur. Erken hiperplastik lezyonlardaki hücrelerin prölifere olma yeteneği bu lezyonların gelişimi konusunda görüşler getirebilmektedir. Bu lezyonlar 2-AAF nin antiproliferatif etkisine dirençlidir ve 2-AAF i daha az aktive ediyor görünümündedir. Karaciğer bir bütün olarak 2-AAF ile beslenme sırasında N-hidroksilasyonunu arttırır. Bu, hücrenin daha zararlı tipte bir metaboliz-

maya doğru yerini değiştirdiğini gösterir (13). Sitotoksik bir çevrede, proliferere olma kabiliyetinde veya diğer selektif faktörlere cevabında yenilikler olur. Selektif şartların sağlanması ile odaklardaki hepatositler proliferere olur ve neoplastik nodüller oluşur (11).

Bazı yayınlarda, bu lezyonlarda sitotoksik olan maddelere karşı gelişen direncin, hücre uptake'in de ya da maddenin metabolizmasında bir değişiklik sonucu olabileceği belirtilmektedir (8,13,40). Direncin gelişimi ksenobiyotik aktivasyonun azalması ve detoksifikasyon sistemlerinin artması sonucu gelişiyor görünümündedir (13).

Karsinojen maddeler, normal karaciğer hücrelerinde daha fazla aktive edilebildiğinden, onlar üzerinde antimitotik etki oluşturmaktadır. Bu nedenle, parsiyel hepatektomi gibi mitojenik stimulusa cevapta bozukluklar ortaya çıkar, ancak proliferatif olan lezyon sahalarında antimitotik etki gözlenmeyebilmektedir (8).

Kemiricilerin karaciğerindeki preneoplastik hücresel değişikliklerin değerlendirilmesindeki zorluklar gittikçe artmaktadır. Çünkü, çeşitli deneysel modellerde gözlenmiş olan fenotipik özellikler stabil olmaktan uzaktır. Neoplastik transformasyonla ilgisi olmayan hücresel reaksiyonlar tarafından taklit edilebilmektedir. Bazı lezyonlar karsinojen çekildikten sonra gerileyebilmektedir, bu duruma "geriye dönük" fenotipik instabilite denilmektedir. Yine preneoplastik hücre popülasyonunun neoplastik transformasyonu sırasında oluşan metabolik ve morfolojik değişiklikler ile ilgili bir "ilerleyici" fenotipik instabilite durumu söz konusu olabilmektedir. İlerleyici fenoti-

pik instabiliteden, hepatokarsinogenezis sırasında birbirini izleyen sitomorfolojik değişiklikler varlığında söz edilmektedir. Örneğin, karbohidrat metabolizmasının alternatif yolunun anahtar enzimleri üzerine yapılan çalışmalar, sıklıkla ve heterojen olarak gözlenen histokimyasal özelliklerin; rastgele olmayıp, karsinogenezis esnasında belirli dönemlerde gelişen ve birbirini izleyen morfolojik, metabolik değişiklikler sonucu olduğunu düşündürmektedir. Bu değişiklikler, sadece karbohidrat metabolizmasının bir özelliği olmayıp, neoplastik transformasyona giden hepatositlerde diğer metabolik yollarda da geliştiğini düşündürmektedir (32).

Elektron mikroskobisi hücrenin stoplazması içinde membrandan yapılmış tüpler ve kese şeklinde veziküllerden ibaret olduğu anlaşılan bir ağın olduğunu göstermiştir. Bu ağa endoplazmik retikülum (ER) adı verilmiştir. Bu ağın membranöz tubuluslarına, hücre içindeki ribonükleik asidin (RNA) % 80 ini taşıyan 10-15 nm çapında küresel granüller yapışır. Bu retiküler granüllere ribozom denilmiştir. Ribozomlar hücre içinde protein sentezinin oluştucu yerlerdir (41).

Deoksiribonükleik asid (DNA) in hücre içindeki metabolik olayları kontrol eden enzimler dahil, spesifik hücresel proteinlerin sentezinin genetiksel kontrolü ile ilgili temel madde olduğu belirtilmiştir. Her insan hücresinin, yaklaşık olarak 7 milyon proteini şifrelemeye yetecek kadar DNA yı içinde taşıdığı tahmin edilmektedir. Bununla beraber DNA nın sadece % 10 u fonksiyonel olarak aktiftir, yani 700.000 kadar proteinin sentezini yönetme kapasitesi vardır. DNA polimerazların katalitik etkisi

aracılığı ile nükleusdaki DNA'nın kopya edilmesi, hücre bölünmesi olayı sırasında yeni hücrelerin teşekkülü için gerektiği şekilde meydana gelir. Bununla beraber DNA, çeşitli tipten RNA teşekkülünü yönetmeye de hizmet etmektedir. DNA'nın haberci RNA [mesenger RNA (mRNA)] sentezini yönetmekteki rolü özellikle önemlidir. Bu role "transkripsiyon" denir. Bu yolla, spesifik proteinlerin primer yapısı (yani amino asit dizisi) için sağlanması gereken DNA'da depo edilmiş genetik bilgi, sitoplazma içinde bulunan protein-sentez edici aygıta geçirilebilir. Bu, nükleus içinde "hibrid" helezon sentezi yolu ile başırlır. Bu yolla bir DNA lifi, tamamlayıcı bir RNA lifinin sentezini yönetir. Her ne kadar, her iki DNA lifinin birlikte var olması mutlaka gerekli ise de, gerçekte sadece bir lif kopya olur. Bu reaksiyon RNA polimeraz tarafından katalize olur. Yeni sentez olmuş RNA molekülü haberci RNA ile birlikte spesifik hücresel proteinlerin sentezini yönetmek üzere bir kalıp olarak hareket ettiği ER yolu ile nükleus dışına geçebilir ve mRNA'nın bu rolüne genetik "haber-mesajın çevirisi" denir (41).

1972'de belirli kromozomlarda ribozomal DNA'nın lokalize olduğu bazı alanlar belirlenmiş ve bu alanlardaki ribozomal RNA genlerine "nücleolar organizör region (NOR)" adı verilmiştir. Bu bölgeler farklı bir nükleoprotein yapısında olup, bunların belirlenmesinde argirofil bir boyama metodu (AgNOR) kullanılmıştır. NOR'ların, RNA polimeraz I ile ribozom için rRNA prekürsörlerinin oluşumunu sağladığı ve de bu nedenle nükleer aktiviteyi yansıtabileceği düşünülmüştür (42,43).

NOR 5 akrosentrik kromozomun kısa kolunda yer alır. NOR proteinlerinin argirofilisi, ribozomal DNA'nın ve

muhtemelen de transkripsiyon düzeyinin bir göstergesi olarak hareket eder (22). Hiperplastik ve neoplastik hadiselerde nükleolusun yapısı (22) ve nükleer aktivite (42,43) hakkında yararlı bilgi sağlayabilir. NOR yine kromozom sayısı (ploidi) nın göstergesi olarak da kullanılmaktadır (43-45).

M A T E R Y A L v e M E T O D

Bu deneysel çalışmada, İstanbul Üniversitesi Deney-sel Tıp Araştırma Merkezi, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı, Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmako-loji Ana Bilim Dalından temin edilen 5-7 haftalık, 100-125 g ağırlığında 71 Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kul-lanıldı. Bu sıçanlardan kur'a yöntemi ile seçilen 5 grup oluşturuldu. Sağlam kontrol grubuna (I. grup), 8, sadece parsiyel hepatektomi (PH) yapılan kontrol grubuna (II. grup) 7, PH yapılan, sonra iron dextran verilen gruba (III. grup) 8, PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan gru-ba (IV. grup) 35, PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan ve de iron dextran verilen gruba (V. grup) 13 sıçan alındı. II, III, IV ve V. deney gruplarına Higgins ve Anderson'un metoduna göre (26) ether anestezisi altında 2/3 (% 60-65) oranında PH yapıldı.

Bu metoda göre:

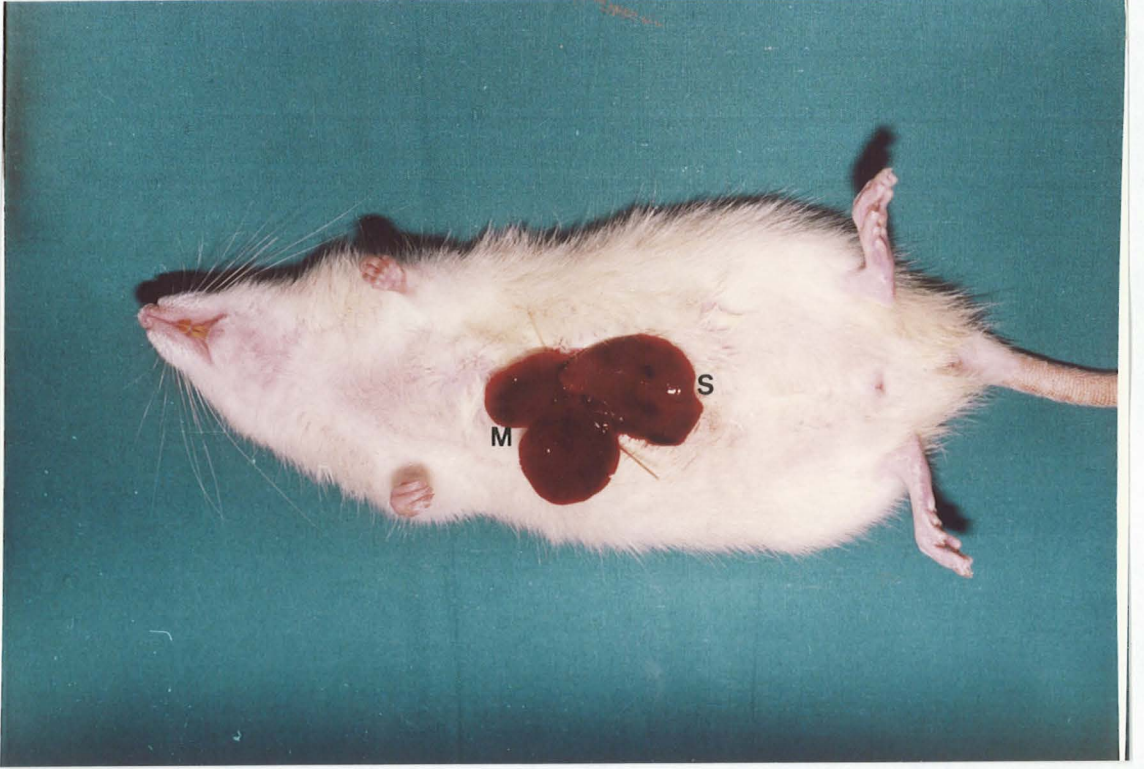
Sıçan supin pozisyonunda yatırıldı. 4 cm kadar kısa bir epigastrik ortahat insizyonu yapıldı. Ksifoidin ucu serbestleştirildi. İki parmak falsifarum ligamentin iki tarafına yerleştirilerek ligament vena kavaya doğru ke-sildi. Toraks ve batına nazik bir bası ile median ve sol lateral loblar insizyon hattına doğru getirilerek hafifçe

yukarı çekildi (Resim 1).



Resim 1. Toraks ve batına hafif bası ile median ve sol lateral lobların çıkarılması.

4/0 katgütü ile iki lob çevrelenerek ve mümkün olduğu kadar vena kavaya yakın mesafeye kadar indirilip bağlandı (Resim 2). An blok portal pedikül ve suprahepatik venlerle çıkarıldı. Sağ lateral lobun suprahepatik veninde gelişerek olan darlığı önlemek için vena kavaya çok yaklaşılmamaya dikkat edildi. Karaciğer parankimi bağlanan alandan 2-3 mm kadar bırakılarak rezeke edildi. Hepatektomi sonrası sağ lateral lob, kaudat lob ve perikaval parankim dokusu kaldı. Böylesi bir hepatektomi % 60-65 lik bir rezeksiyona tekabül etmektedir (26).



Resim 2. Median ve lateral lobların çıkarıldıktan sonra bağlanması. M: Median lob, S: Sol lateral lob.

Parsiyel hepatektomi yapılan ve sağlam kontrol grubu olarak ayrılan tüm sıçanlara Eskişehir Yem Sanayii Fabrikası'ndan temin edilen sıçan yemi verildi.

IV. ve V. grup olarak ayrılan tüm sıçanlara PH yapıldıktan sonra 3. günden itibaren 200 mg/kg olacak şekilde 2-AAF (Sigma Chemical Company) içeren özel diet başlandı. Bu diet kontrol gruplarına verilen aynı yem toz haline getirildikten sonra içersine belirtilen miktarı sağlayacak kadar 2-AAF karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan bu diet buzdolabında +4°C de saklandı ve günlük olarak 100 g sıçan ağırlığına 5-10 g olacak şekilde verildi, su ihtiyacı çeşme suyundan karşılandı.

Eskişehir Yem Sanayiinden alınan yemin içeriği şu şekildedir:

1000 kg yem içerisinde 67 kg kepek, 50 kg melas, 170 kg ayçiçeği, 260 kg arpa, 43 kg soya, 77 kg et, kemik unu, 250 kg buğday, 5 kg ayçiçek yağı, 4 kg DCP, 70 kg balık unu, 21 kg kadmioks mevcuttur.

5 grup deney hayvanı oda ısısında ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta tutularak 5 ay süre ile takip edildi. Bu süre içerisinde I. deney grubu sıçanlarından 2, II. gruptan 1, III. gruptan 2, IV. gruptan 14, V. gruptan 6 deney hayvanı ex oldu. I., II. ve III. grup deney hayvanları, deney başlangıcından sonraki 2 ay içerisinde ex oldular ve bu hayvanlar değerlendirmeye alınmadılar. IV. gruptan 12 hayvan ilk 2 ayda ex oldukları için, diğer 2 si ise otoliz olmaları nedeniyle değerlendirmeye alınmadılar. Bu grupta kalan diğer 21 hayvandan 10 tanesi deney başladıktan 3 ay sonraki dönem içerisinde aralıklı sürelerle ex oldular, değerlendirmeye alındılar. Kalan 11 sıçan deney bitiminde ether anestezisi altında öldürüldüler.

V. grup deney hayvanlarından ise ilk 2 ay içerisinde ölen 6 hayvan değerlendirmeye alınmadı. III ve V. deney grubundaki sıçanlara deney bitiminden 15 gün önce, haftada 3 kez olacak şekilde toplam 6 enjeksiyon halinde inguinal bölgeden subkutan ve 0.1 ml/40 g dozunda iron dekstran (Sigma Chemical Company, 15 ml) verilerek deney sel hemosiderozis oluşturuldu. Deney bitiminde tüm hayvanlar ether anestezisi altında öldürüldüler. Vücut ağırlıkları ölçülen hayvanların otopsileri yapılarak karaciğer ağırlıkları da tartıldı. Ağırlık değerleri ortalama-
larının gruplar arasında karşılaştırılması tek yönlü var-

yans analizi ile yapıldı. Deney hayvanlarının karaciğerleri disseke edildikten sonra bir kısımları PAS boyama yöntemi için % 96 lık absolü alkole koyuldu. Kalan karaciğer dokuları ise % 10 luk formalinde tespit edildi.

Tüm hayvanların karaciğerleri 0.2 mm aralıklarla dilimlendi. Her hayvan karaciğerinden sağ lateral lob ve kaudat lobların tüm kısımlarından olmak üzere bütün loblardan toplam 10 parça alındı. Hazırlanan parafin bloklardan 5-6 mikron kalınlığında kesitler yapılarak hemotoksilen eozin ile boyandı. Bazofilik hücre içeren odaksal lezyon ve nodüllerin görüldüğü kesitler toluidin mavı boyama metodu ile boyandı. Ayrıca % 96 lık absolü alkolde tespit edilen doku örnekleri PAS boyama metodu ile boyandı. Tüm sıçan karaciğerlerinden alınan doku örneklerinde mikroskopik inceleme ile tespit edilen odaksal lezyon, nodüler lezyon içeren ve de tüm kontrol gruplarından alınan doku örnekleri AgNOR boyama tekniğı ile boyandı (23). Ayrıca iron dekstran verilen III. ve V. deney gruplarından hazırlanan preparatlar Prusya mavisi ile boyandı.

AgNOR BOYAMA METODU

1. Parafin bloklardan 2-3 mikron kesit alınır.
2. Deparafinizasyon, bir gece etüvde tutulur, 3 kez ksilolden geçirilir.
3. Dehidrasyon: 70, 80, 90, 96, 100, 100 alkollerden geçirilir. Alkoller hazırlanırken deiyonize su kullanılmalıdır.
4. Deiyonize su ile en az 10 dakika yıkanır.

5. % 2 g toz jelatin içeren % 1 lik
formik asid Solusyon A
% 50 gümüş nitrat Solusyon B

(Solüsyon A ve B hazırlanırken deiyonize su kullanılmalıdır). Solüsyon A ve B eşit oranlarda karıştırılarak boya hazırlanır. Boya taze hazırlanmalı ve hemen kullanılmalıdır. Kullanımı sırasında ışık almamalıdır. Boya doku kesitleri için ancak bir kez kullanılabilir. Boyama süresi oda ısısında 30-35 dakikadır.

6. Preparatlar deiyonize su ile en az 10 dakika yıkanır.

7. % 1 lik light green ile zemin boyası yapılır (1 dakika).

8. Deiyonize su ile yıkanır.

9. Üç kez taze ksilolden geçirilerek Kanada balsam ile kapatılır.

10. İmmersiyon objektifi ile hücre nükleusunda AgNOR sayılır, mitotik figürler sayı dışı tutulur.

Deney gruplarına ait karaciğerlerde izlenen patolojik bulgulardan odaksal lezyon, nodüler lezyon, oval hücre proliferasyonu ve fokal nekroz, sağ lob ön ve arka kısımları ve kaudat lobda ayrı ayrı 10 luk büyütme ile 10 sahada sayılarak değerlendirildi. Ancak bu belirlenen değerler, sağ lob ön ve arka kısımları ile kaudat lob arasında istatistiksel olarak farklılık göstermediği için toplam 30 sahada yapılan sayılar üçe bölünerek ortalamaları alındı. Lezyonlar Tablo 1 de gösterildiği şekilde derecelendirildi. Bu dereceler Fischer'in tam x^2 analizi uygulayabilmek için indirgenerek hafif-orta ve şiddetli dereceler var şeklinde Tablo 5 de gösterildiği gibi dü-

zenlendi.

Tablo 1. Lezyonların derecelendirilmesi.

	<u>Odaksal lezyon</u>	<u>Nodüler lezyon</u>	<u>Oval hücre proliferasyonu</u>	<u>Fokal nekroz</u>
Yok	0-1	0-1	0	0
Hafif	1.1-6.3	0.1-0.6	1	1
Orta	6.4-10.6	0.7-2	2	2
Şiddetli	10.7-43.6	2.1-5	3	3

Not: Bu tablodaki değerler tüm lezyonlar için 10 luk büyütme ile 10 sahada görülen ortalama değerlerdir.

AgNOR boyası ile yapılan mikroskopik değerlendirmelerde de I., II. ve III. gruplara ait preparatlarda toplam 20 hepatosit nüvesinde sayılan AgNOR değerleri 20 ye bölünerek hücre başına düşen ortalama AgNOR sayısı hesaplandı. IV. ve V. grup sıçan karaciğerlerinde odaksal ve nodüler lezyon ile çevre normal görünümlü alanlardan ayrı ayrı 20 şer hücre nüvesindeki AgNOR sayısı sayılarak tek hücre nüvesi başına düşen ortalama AgNOR değeri saptandı. AgNOR değerleri nükleolusla birlikte nüve içerisinde boyanmış tüm siyah noktalar sayılarak değerlendirilmiştir.

Tüm grupların ortalama AgNOR değerlerini gösteren Tablo 6 kullanılarak tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel karşılaştırma yapıldı.

B U L G U L A R

Deney başlangıcında ağırlıkları 100-125 g olan erkek sıçanlarda, 5 aylık deney süresinde bazı deney grupları arasında büyüme farklılıkları olduğu gözlemlendi. I. gruba ait deney hayvanları bu süre zarfında ortalama 162 ± 12 g ağırlığa ulaştılar. Otopsilerinde bu deney grubuna ait karaciğerlerin ortalama ağırlıklarının 7.0 ± 5.2 g oldukları saptandı. II. grup deney hayvanlarının vücut ağırlık ortalamaları 158.2 ± 9 g olarak bulundu. Karaciğer ağırlık ortalaması ise 6.95 ± 0.63 g olarak tespit edildi. III. grup deney hayvanlarının vücut ağırlık ortalamaları 160.83 ± 14.29 g, karaciğer ağırlıklarının ortalaması 6.90 ± 0.77 g idi. IV. grup deney hayvanlarının vücut ağırlık ortalamaları 94.29 ± 8.84 g, karaciğer ağırlıklarının ortalaması 3.27 ± 0.43 g olarak tartıldı. V. grup deney hayvanlarının vücut ağırlık ortalamaları 96.43 ± 11.44 g, karaciğer ağırlıklarının ortalamaları 3.39 ± 0.56 g idi.

I, II, III. grup vücut ve karaciğer ağırlıkları birbirleriyle istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldığında aralarında önemli bir farklılık göstermedikleri tespit edildi. Bu nedenle karşılaştırmaya alınmadı. IV. ve V. gruptaki deney hayvanlarının vücut ağırlıkları birbirlerine benzemekle be-

raber, ortak özelliğe sahip diğer 3 gruba göre belirgin olarak düşüktü (III, IV ve V nolu grup sıçanların vücut ve karaciğer ağırlıkları Ek-Tablo 1 de, karşılaştırmaları Tablo 2 ve 3 de verilmiştir).

Tablo 2. Grup ortalama, st.sapma, st.hata ve karşılaştırmaları.

Grup	Denek sayısı	Ortalama (x)	St.sapma (s)	St.hata (SHx)	Karşılaştırma
III	6	160.83	14.29	5.83	B
IV	21	94.29	8.84	1.93	A
V	7	96.43	11.44	4.33	A

YORUM: Grup ortalamaları arasında önemli fark vardır ($p < 0.001$). III. grup ile IV. ve V. grup sıçanların vücut ağırlıkları birbirlerinden oldukça farklı olup, IV. ve V. grupların vücut ağırlıkları III. gruba göre düşüktür.

Tablo 3. Grup ortalama, st.sapma, st.hata ve karşılaştırmaları.

Grup	Denek sayısı	Ortalama (x)	St.sapma (s)	St.hata (SHx)	Karşılaştırma
III	6	6.90	0.77	0.31	B
IV	21	3.27	0.43	0.09	A
V	7	3.39	0.56	0.21	A

YORUM: Grup ortalamaları arasında önemli fark vardır ($p < 0.001$). III. grup ile IV. ve V. grupların karaciğer

ağırlıkları oldukça farklılık göstermekte olup, IV. ve V. grupların karaciğer ağırlıkları belirgin olarak III. gruptaki sıçan karaciğerlerinden küçüktür.

DENEY GRUPLARINDAKİ SİÇAN KARACİĞERLERİNDE MAKROSKOPİK BULGULAR

I. grup deney hayvanlarında karaciğerin makroskopik görünümü doğal olup, 4 loblu idi. Karaciğer gevrek kıvamlı, kaygan, parlak ve koyukırmızı renkte idi (Resim 3).

II. grup sıçanlarda karaciğer deney başlangıcında yapılan 2/3 PH nedeni ile 2 loblu olup, sağ lateral lob ön ve arka olmak üzere 2 kısımdır (Resim 4). Normalde eşit boyutlarda olması gereken sağ lateral lob kısımlarının farklı büyüklüklerde olduğu gözlemlendi, ön kısmın arkaya oranla çok daha fazla büyüme gösterdiği dikkati çekti. Normalde derin bir frontal fissürle ince quadrilateral iki kısma ayrılan kaudat lobun normale göre hafifçe büyüdüğü, ancak kısımlarının birbirlerine göre form ve büyüklük oranını koruduğu görüldü. Karaciğerin kıvamı ve kesit yüzü doğaldı.

III. grup sıçanlarda karaciğer lob sayısı itibariyle II. gruba benzer olup, boyutu daha büyük idi. Lobların büyüme özellikleride II. grup sıçanlarındaki gibi idi. İki lob ve kısımlarının renkleri tüm alanlarda açık pas renginde idi. Kesit yüzleri de aynı renk değişikliği göstermekte olup, hafif sert kıvamda idi (Resim 5).



Resim 3. Sıçan karaciğerinin lobları.

M: Median lob, S: Sol lateral lob,
SL: Sağ lateral lob, K: Kaudat lob.



Resim 4. Parsiyel hepatektomi sonrası rejenere olmuş karaciğer dokusu.



Resim 5. Parsiyel hepatektomi ve hemosiderozis oluşturulmuş III. deney grubuna ait bir sıçan karaciğeri. Karaciğer açık pas rengindedir.

SLA: Sağ lateral lob on kısmı,

SLP: Sağ lateral lob arka kısmı,

K: Kaudat lob.

IV. grup sıçanlarda karaciğer II. ve III. gruptakilerde olduğu gibi 2 lob ve kısımlarından ibaretti. Boyut olarak III. grup deney hayvanlarının karaciğerlerine göre farklı derecede küçüktü. Lobların büyüme özellikleri II. ve III. deney grubu hayvanlarındaki gibi olup, 2 sıçanda PH yapılmış olan alandan büyümüş, birisinde kaudat lob boyutundan daha büyük görünümde ayrıca bir lob parçası görüldü. Bunun PH sırasında katkütle loblar çevrelenirken yeterince vena kavaya yaklaşılamaması sonucu fazlaca bırakılan medial ya da sol lateral loblardan gelişmiş olabileceği düşünüldü. Genellikle karaciğer dokusu hafif donuk ve koyu kahverenkli olup, kıvamları gevrekdi. Bu grup deney hayvanlarından 2., 3., 4., 7., 11. ve 19. deneklerde dış yüzden bakıldığında genellikle sub kapsüler sahalarda 0.1-0.2 mm büyüklüğünde, dış yüzeyden hafif kabarık, gri-beyaz renkte bir kısmı çevreden düzensiz olarak sınırlı görünümde nodüle benzer yapılar görüldü. Bu lezyonlar dokunun kesit yüzlerinde de gri-beyaz renkte ve aynı boyutlarda parankim içersinde de mevcuttu (Resim 6).

V. grup sıçanların karaciğerleri II., III. ve IV. gruplarda olduğu gibi 2 loblu idi. Boyut olarak IV. grup hayvan karaciğerlerine yakın büyüklükteydiler. Dış yüzden bakıldığında ve kesit yüzlerinde açık pas renginde olup, kıvamları sertleşmişti. Bu grup sıçanlardan 1, 2, 3, 5, 6 ve 7 nolu deneklerde IV. grupta görülenlere benzer özellikleri taşıyan nodüler yapılar mevcuttu. Sıçanların vücut ve karaciğerlerinin ağırlıkları Ek Tablo 1 de verilmiştir.



Resim 6. Parsiyel hepatektomi sonrası verilen 2-AAF e bağı gelişen nodüler lezyonlar.

MİKROSKOPİK BULGULAR

Deney gruplarındaki sağlam kontrol (I. grup), PH yapılan (II. grup), PH yapılan ve iron dextran verilen (III. grup), PH yapılan ve diyetiyle 2-AAF alan (IV. grup) ve PH yapılan diyetiyle 2-AAF alan ve de iron dextran kullanılan (V. grup) deney hayvanlarında gözlenen histopatolojik bulgular Ek Tablo 2 de gösterilmiştir.

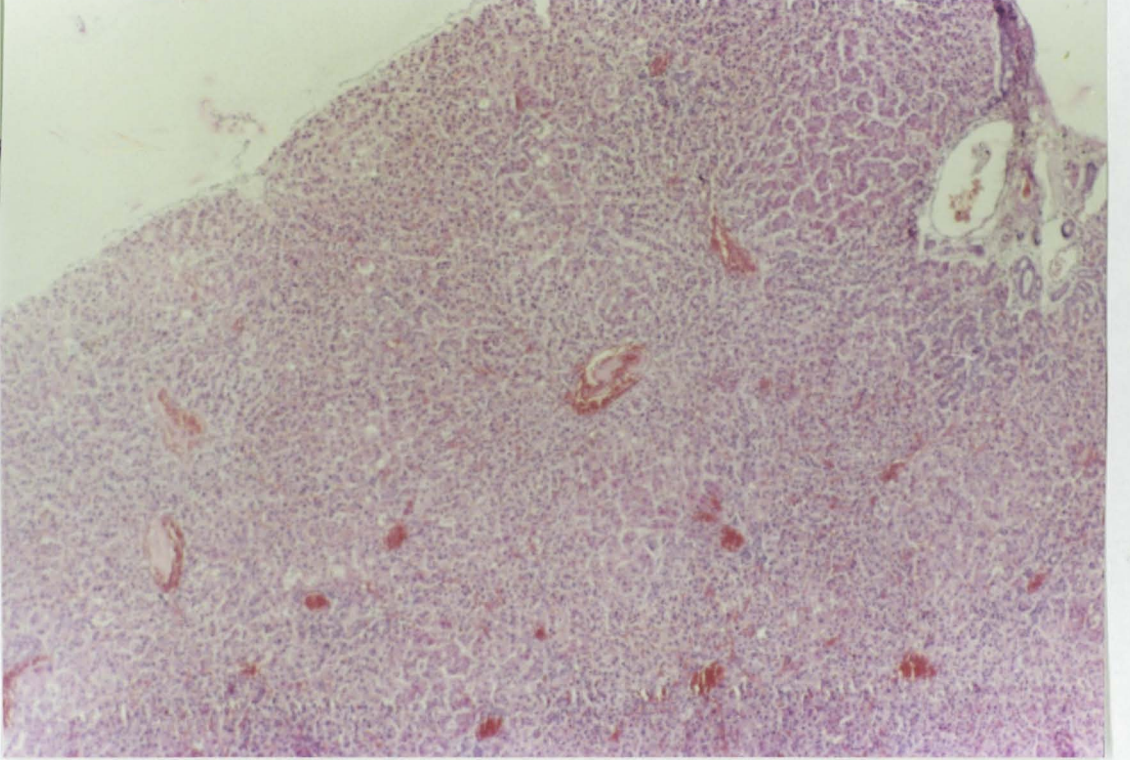
Bulgularımıza göre I., II. ve III. gruplardan sadece II. grup da 10 luk büyütme ile 10 sahada tek bir odaksal lezyon ve de II., III. de daha fazla olmak üzere 10 sahada 1 ya da 3 fokal nekroz alanları kaydedilmiştir.

IV. ve V. gruplarda gözlenen odaksal lezyon sayısı oldukça çarpıcıdır. Sadece bu iki grupta nodüler lezyon görülmüştür. Belirtilen nodüler lezyonlar 10 luk büyütme ile 10 sahada sayılan nodül sayısıdır. Nodüler lezyonların makroskopik gözlemle kaudat lobdaki sayılarının daha fazla olduğu görülmüştür. Yine bu iki grupta oval hücre proliferasyonu gözlemlendi. Oval hücre proliferasyonu V. grupta oran olarak daha fazla idi. Fokal nekroz yönünden bu iki grup arasında pek farklılık yoktu.

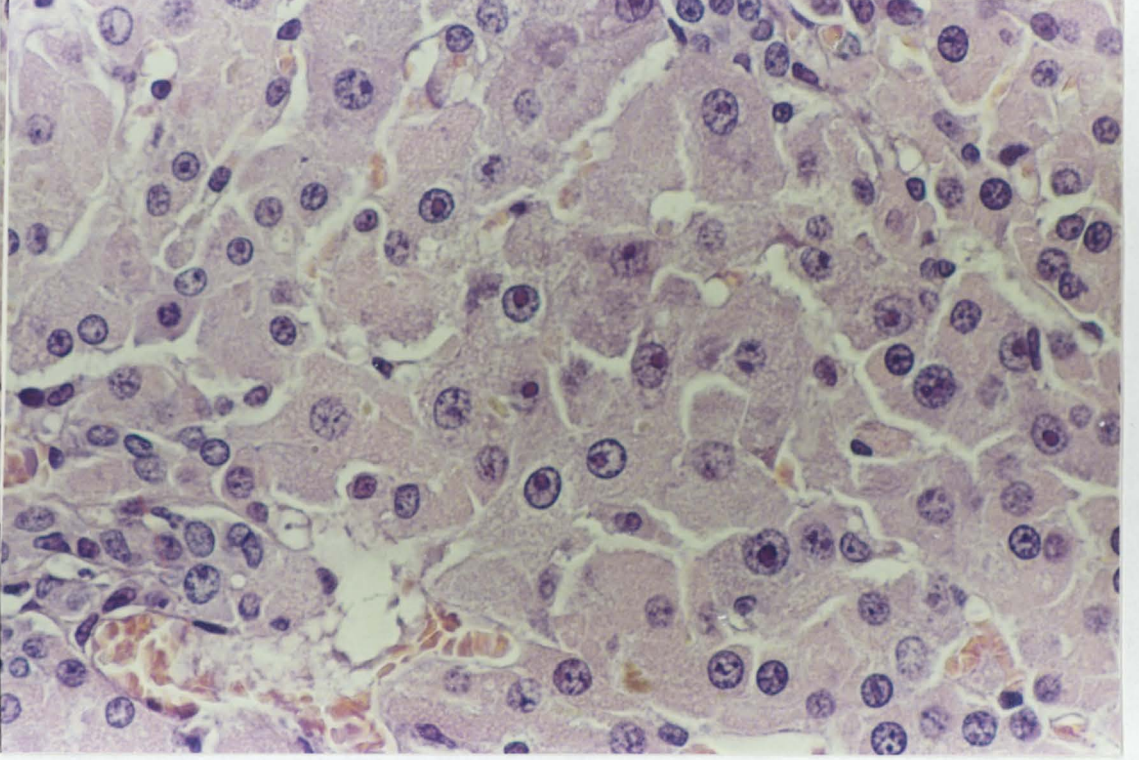
Deney gruplarında gözlenen histopatolojik bulguların mikroskopik görünimleri şu şekilde idi:

Odaksal lezyon: Karaciğer lobüllerinde belirgin bir lokalizasyon göstermeyen çevre parankimden değişik düzende, çevre hepatositlerden farklı büyüklük ve boyanma özellikleri olan bazı odaklar görüldü. Bu odakların boyutları farklı olup 4-150 hücre içeriyordu. Odaklar büyüdükçe çevre parankimden daha sınırlı bir görünümde

idiler. Bu çalışmada bir lobülden küçük boyutta olan lezyonlar "odaksal lezyon" başlığında toplandı. Bu lezyonlar, genellikle büyük boyutlu, eozinofilik ve buzlu cam görünümünde sitoplazmaya sahip, sitoplazma sınırları belirgin, genellikle tek ve ortada yerleşimli nükleolusa sahip iri ve vezikülnüveli hücrelerden oluşmaktaydılar. Çevre hepatositlerle içiçeydiler. Bu odaklarda hepatositlerin kordon yapıları bozulmuş olup, ikili sıralanmalar gösteriyordu ya da gruplar oluşturmuşlardı (Resim 7, 8).



Resim 7. Yukarıda karaciğer parankimi içersinde lokalizasyonu değişken olan, çevreden daha eozinofilik boyanmış odaksal lezyonlar görülmektedir. H.E.X12,8

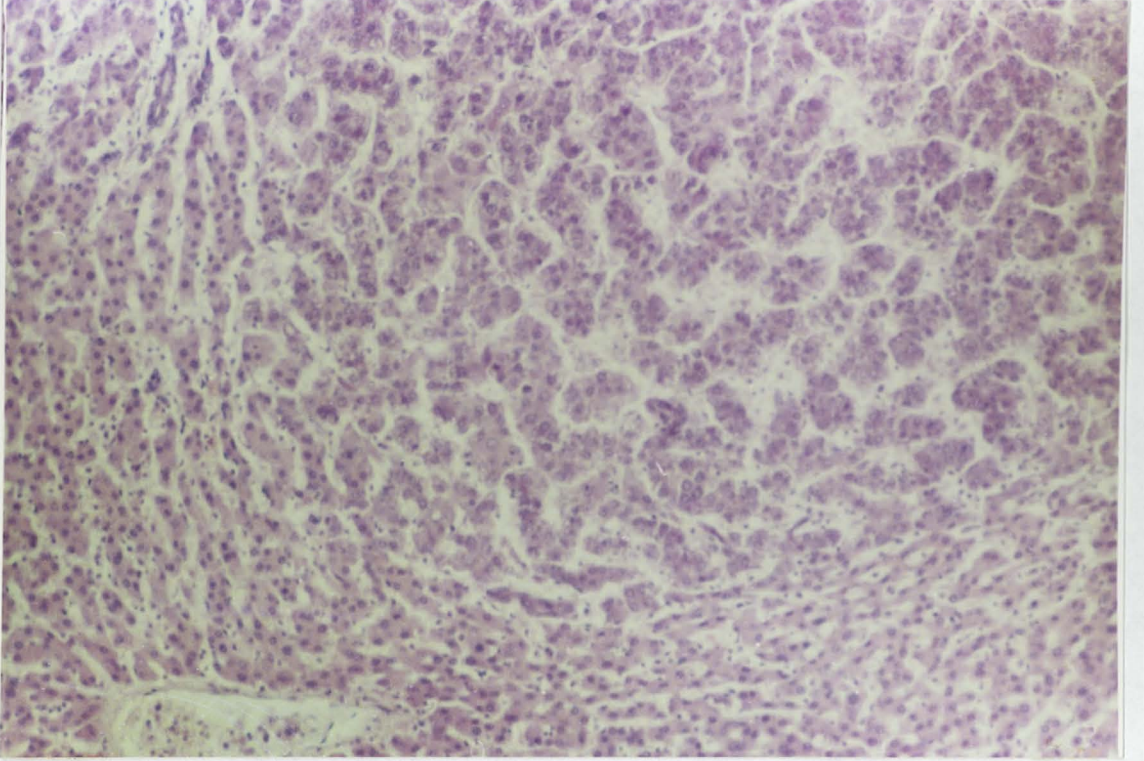


Resim 8. Odaksal lezyonlarda yer alan bir kısmı buzlu cam görünümünde asidofilik hücreler görülmektedir. Bu hücrelerin nüveleri veziküler olup, tek ve eozinofilik nükleolusları dikkati çekmektedir. H.E.x128

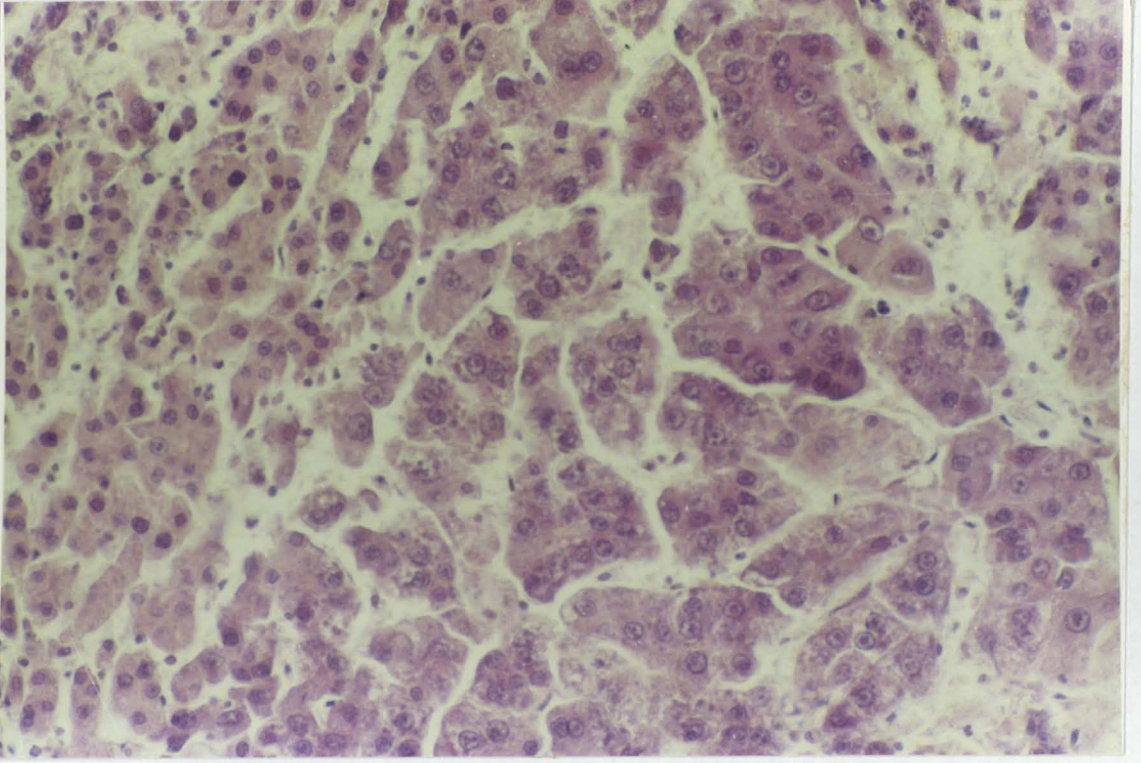
IV. grupta 2,7,11 nolu deneklerde sitoplazmik değişiklikleri bazofili gösteren bazı odaklar gözlemlendi.

Nodüler Lezyon: Bir lobülden daha büyük boyutlu olan ve hücresel özellikleri odaksal lezyonlardakilere benzer, bir kısmı Toluidin mavi boyama metodu ile de hafif bazofili gösteren hücrelerden oluşmuş lezyonlar nodüler lezyon olarak kabul edildi. Bazofilik hücre içeren

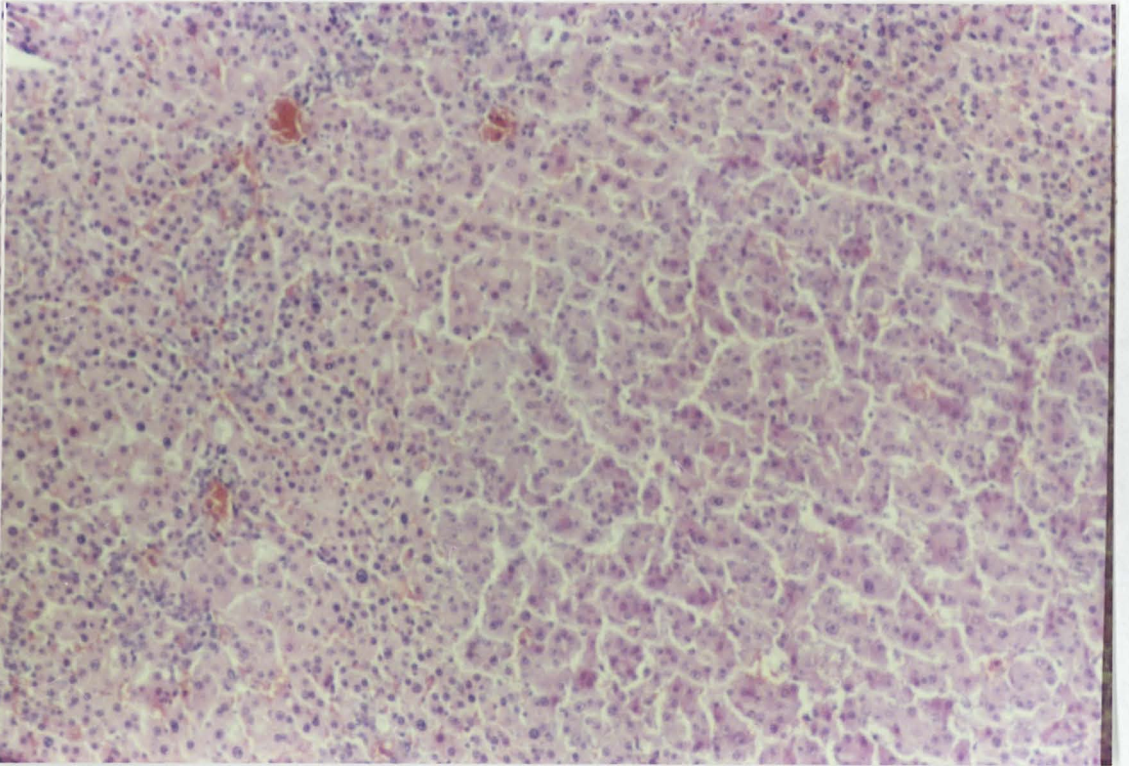
nodüller IV. grupta 2.7 ve 11 nolu deneklerde görüldü. Nodüler lezyonlar çevreden sınırlı ve genellikle çevre parankimi sıkıştırmış görünümde idi (Resim 9, 10, 11, 12).



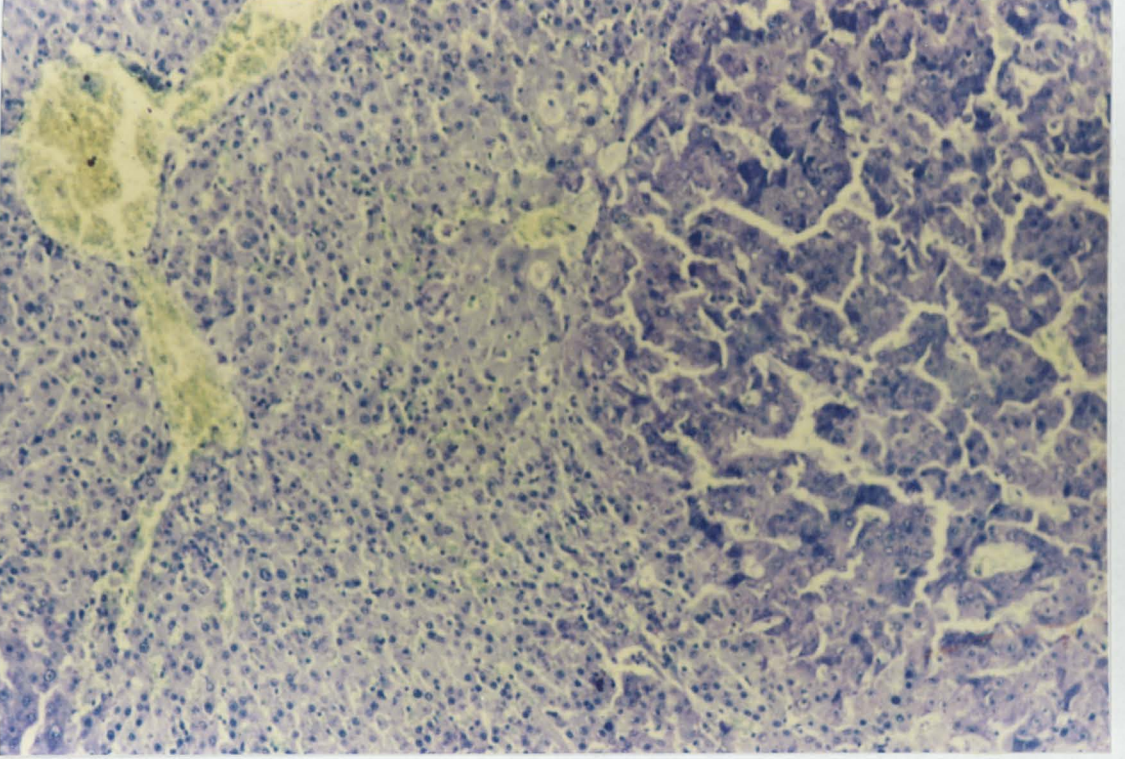
Resim 9. Yukarıda izlenen nodüler lezyon çevreden sınırlı görünümde olup, etrafındaki hepatositleri sıkıştırmıştır. H.E.X32



Resim 10. Nodüler lezyon ve çevre parankim hücrelerinin karşılaştırılması. Lezyon sahasındaki hepatositler daha büyük boyutlu olup, nükleolusları belirgin, nüveleri iri ve veziküler görünümdedir. H.E.X64



Resim 11. Yukarıdaki nodülde çevrede yer alan bazı hücreler asidofilik sitoplazmalı olup, orta alanlarda yer alan bazı hücreler bazofiliktir. H.E.X32

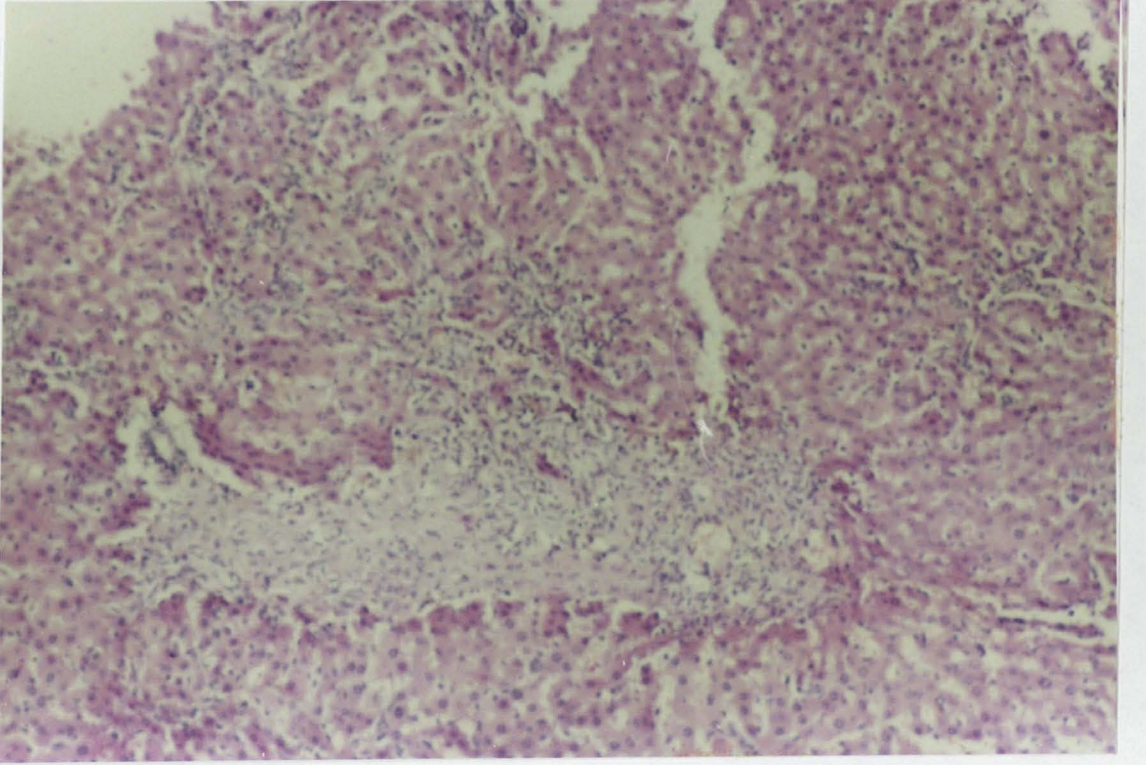


Resim 12. Aynı nodülün toluidin mavisi ile boyandığında çevresindeki hücrelerden daha mavimor renkte boyandığı görülmektedir. Toluidin mavisix32.

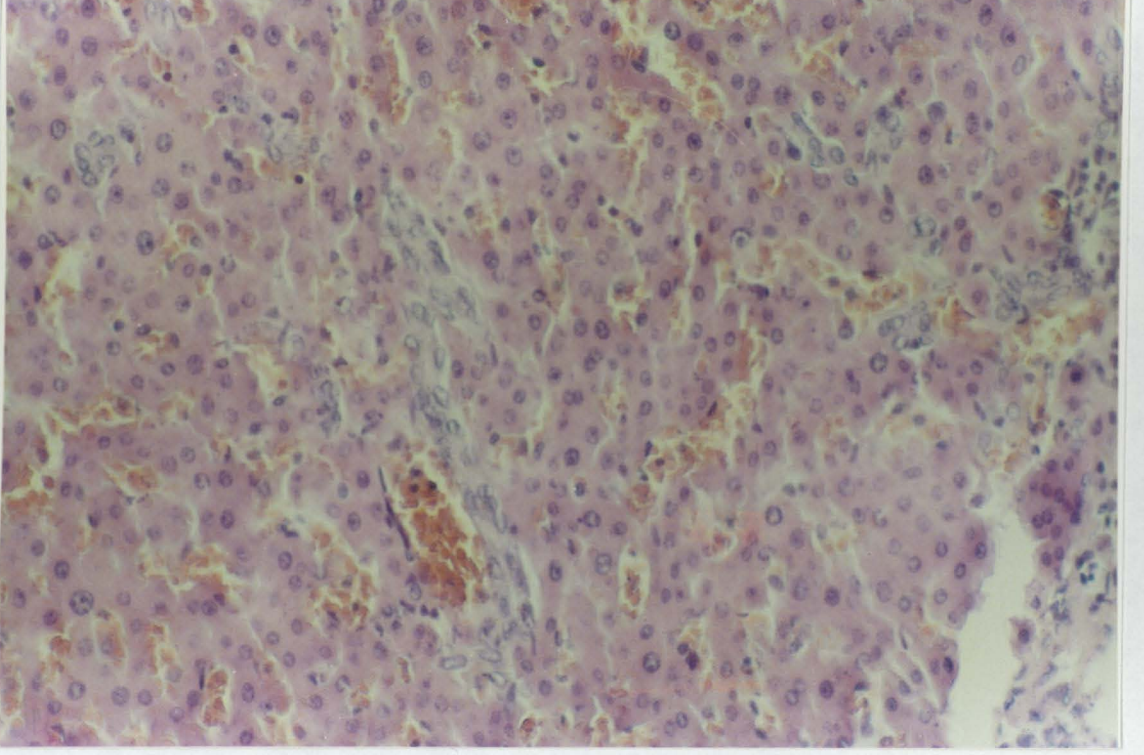
Nodüler ve odaksal lezyonlarda az miktarda mitotik aktivite görüldü.

Oval hücre proliferasyonu: Oval hücreler soluk boyanan içsi nüveye sahip, sitoplazmaları seçilemeyen hücrelerdir. Bu hücreler genellikle lobüllerin periportal sahalarında gözlemlendi; ancak bazen bu hücreler, lobüllerin değişik alanlarında da görüldü. Bir kısmı sinüzoidler boyunca gruplar halinde ilerler görünümünde iken, ba-

zıları da hepatositleri çevrelemiş ya da duktus oluşturmaya meyil etmiş olarak gözlendiler (Resim 13, 14).



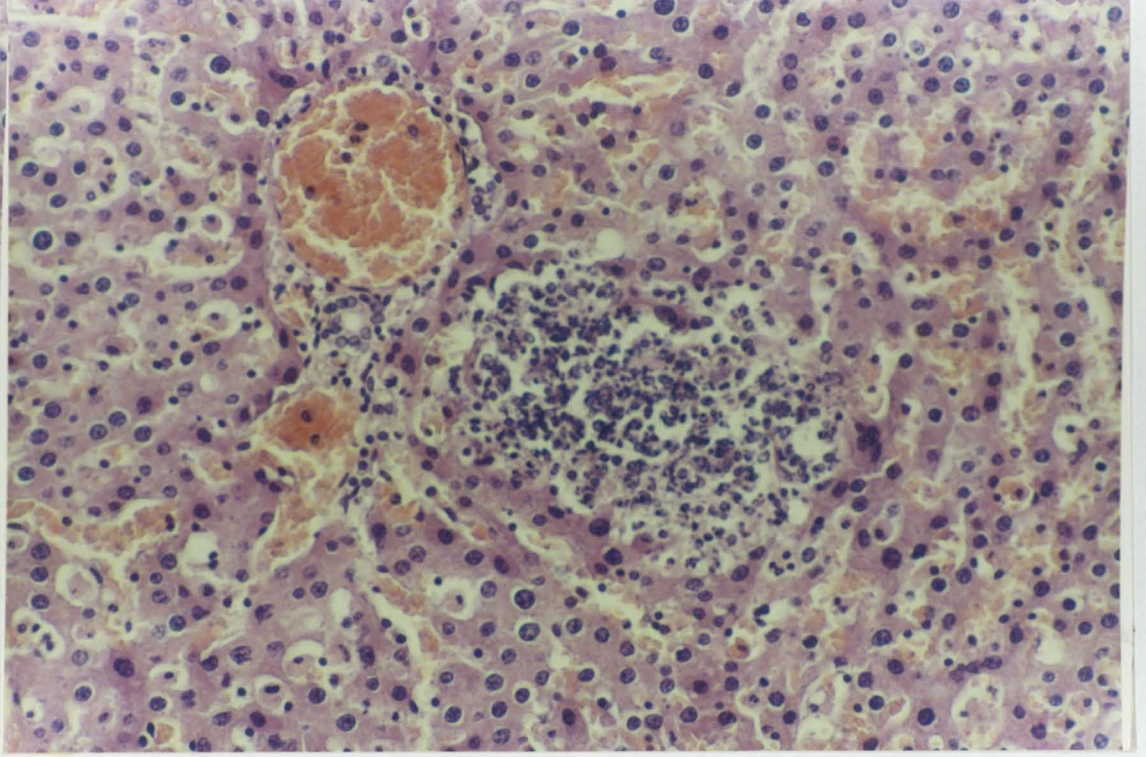
Resim 13. Yukarıda periportal sahalardan lobül içe-
risine uzanan, soluk boyanan, sitoplazma-
ları seçilemeyen oval hücreler görülmek-
tedir. H.E.X32



Resim 14. Periportal alanlardan lobül içerisine uzanan oval hücreler daha yakından görülmektedir. H.E.X64

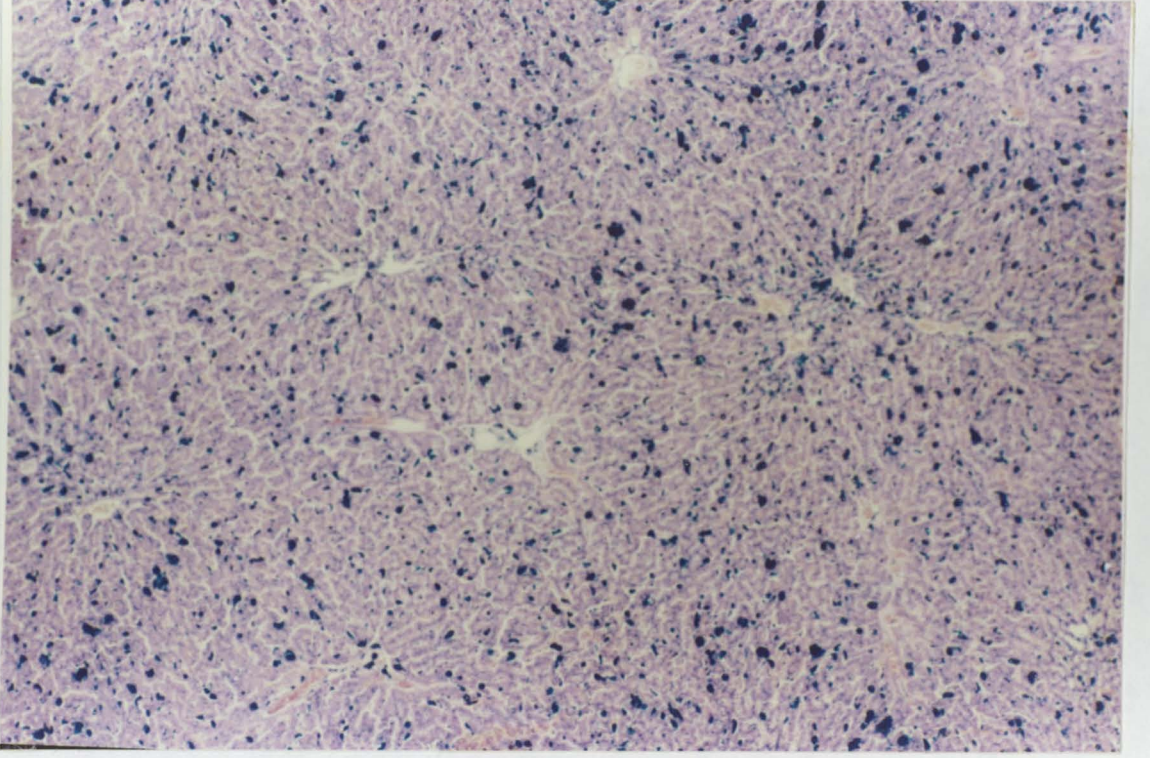
Fokal nekroz: Bu alanlar değişik lokalizasyonlarda, genellikle nekrotik hepatositlerin üzerinde mononükleer ve polimorf nüveli lökositlerin toplandığı alanlar olarak görüldüler (Resim 15).

Yukarıda anlatılan histopatolojik bulgular dışında IV. ve V. deney grubunda ayrıca belirgin lokalizasyon göstermeyen hiperkromatik, pleomorfik nüveli, sitoplazma sınırları iyi seçilemeyen tek ya da bir kaç hücreli odaklar halinde hepatositler dikkati çekmiştir.



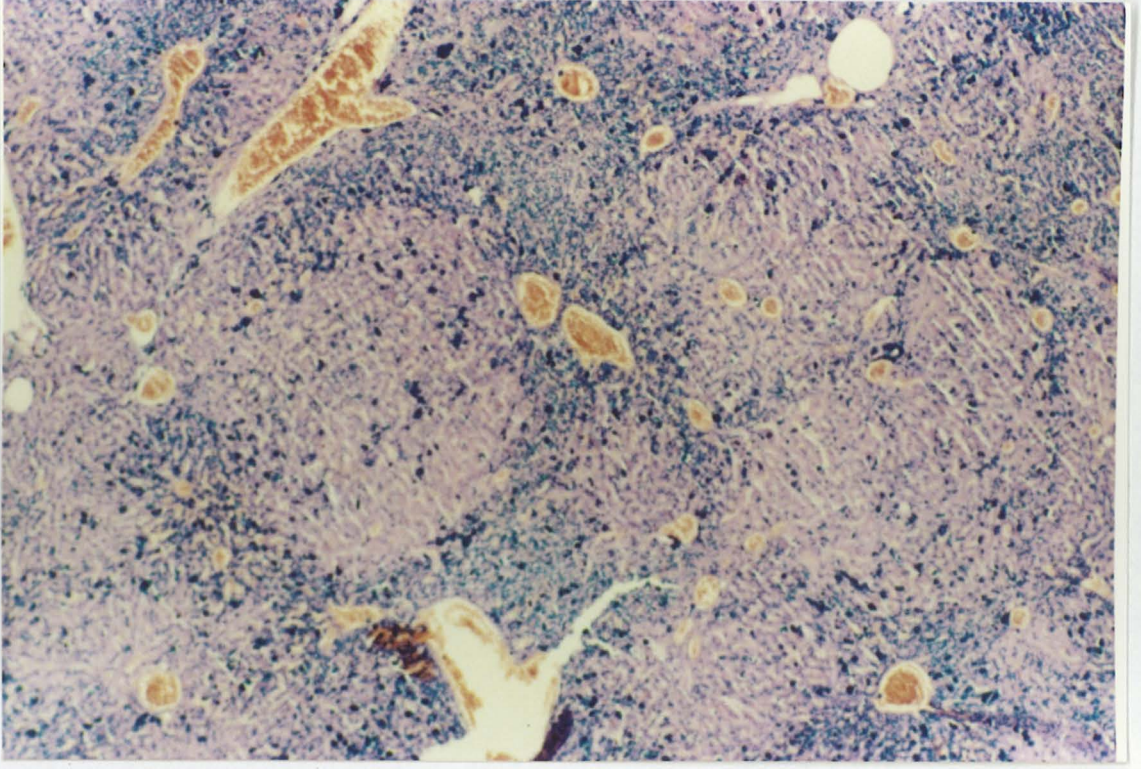
Resim 15. Yukarıdaki kesitte parankim içerisinde bir alanda geniş, polimorf nüveli lökositler ve nüve kırıntılı ile mononükleer iltihabi hücreleri içeren nekroz alanı görülmektedir. H.E.X64

Kontrol grubu deney hayvanlarından III. grupta iron dextran ile oluşturulan hemosiderozis sonucunda demir tutulumunun tüm hepatositlerde aynı oranda olduğunu gözledik. Ayrıca demirin Kupffer hücrelerinde de tutulduğunu gördük. Kupffer hücreleri sitoplazmalarında birikmiş olan demir nedeniyle boyutça oldukça büyümüşlerdi (Resim 16). Bu çalışmada V. grup deney hayvanlarında pa

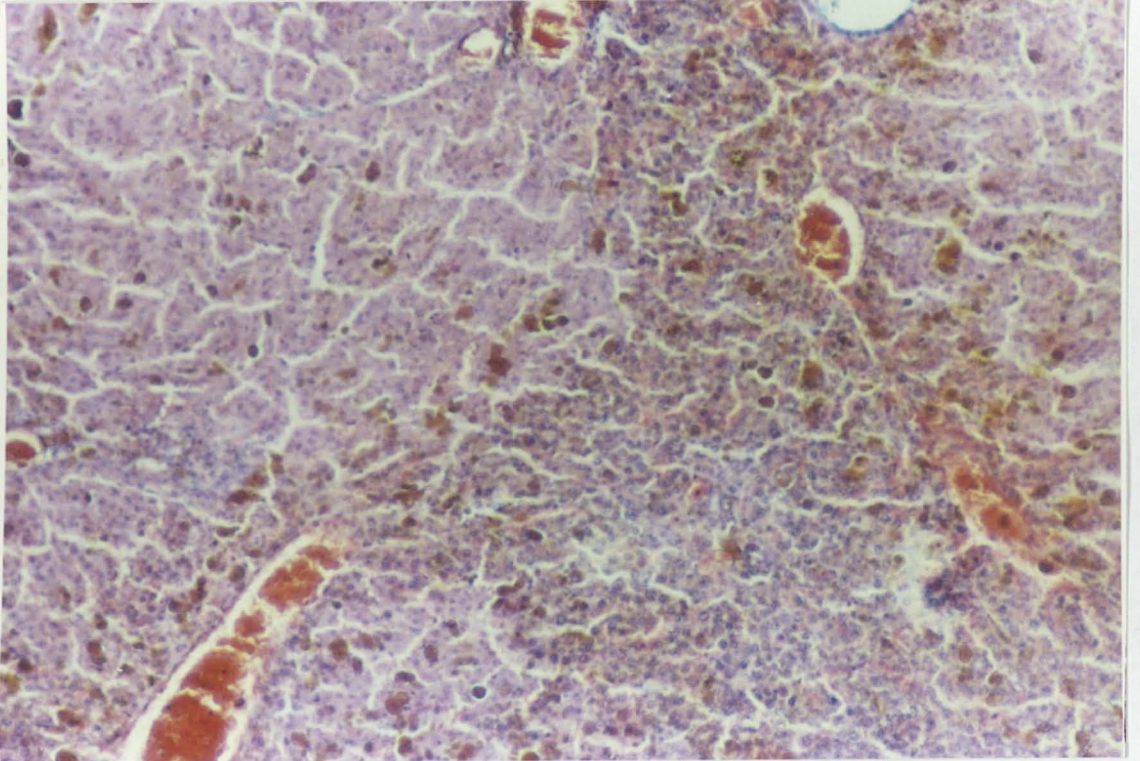


Resim 16. III. kontrol deney grubunda hemosiderozis oluşturulan deneklerde demirin tüm hepatositlerde aynı derecede tutulduğu görülmektedir. Prusya mavisiX12.8

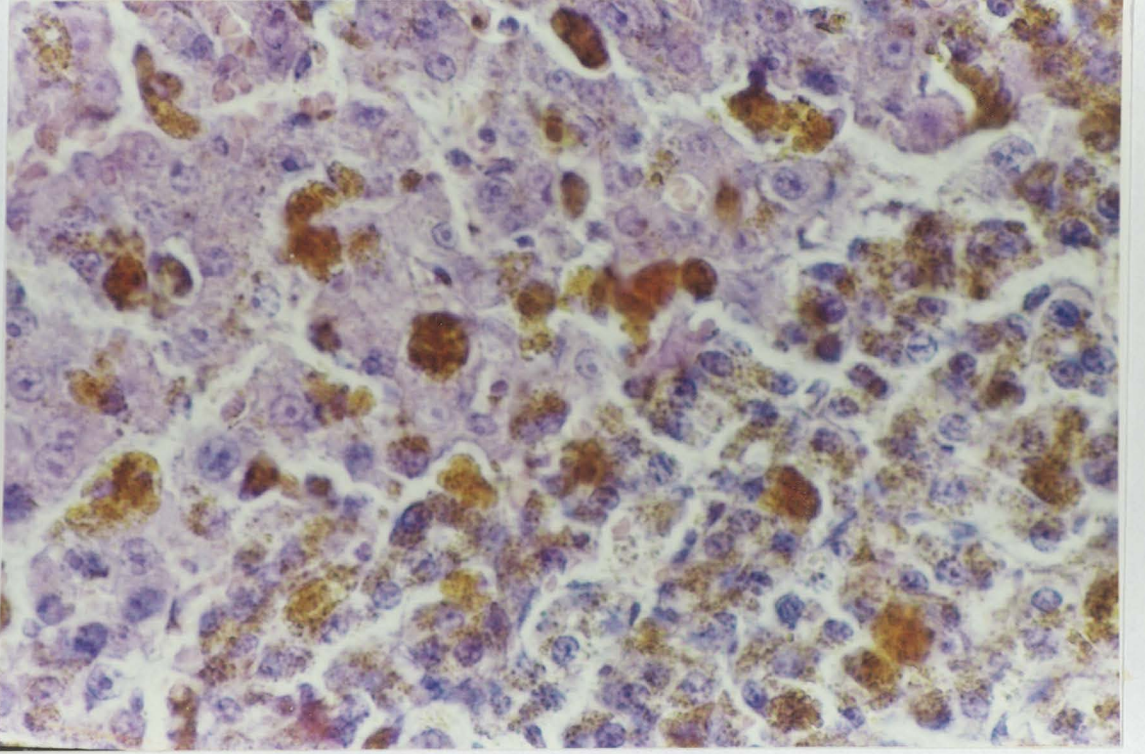
ranteral olarak verilen iron dextran ile oluşturulan hemosiderozis sonucu, hemotoksilen eozin ve Prusya mavisi ile yapılan boyamalarda, lezyonlardaki hepatositlerde demirin tutulmadığı ya da çevre parankime göre daha az oranda biriktiği görülmüştür (Resim 17,18, 19). Bu grupta da gözlenen Kupffer hücrelerindeki demir tutulumunun III. gruplardakinden farklı olmadığı görülmüştür. Ayrıca glikojen birikimi yönünden yapılan PAS boyasında lezyon odaklarında bir özellik saptanmadı.



Resim 17. Hemosiderozis oluşturulan V. deney grubunda odaksal ve nodüler lezyonlarda demirin az ya da hiç tutulmadığı görülmektedir. Prusya mavisi x12.8



Resim 18. Odaksal ve nodüler lezyonlarda, çevre parankimi ile karşılaştırıldığında demir tutulumunun az ya da hiç olmadığı görülmektedir. H.E.X64



Resim 19. Büyük büyütme ile lezyonlu alan ve çevre parankim dokusunun demir içeriğinin karşılaştırılması. H.E.X128

Deney gruplarında gözlenen histopatolojik bulguların Tablo 1 de bildirilen derecelendirme şekline göre Tablo 4 ve Tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 4 de derecelendirilen lezyonlar; hafif, orta ve şiddetli olanları "var" sınıfına alınarak, bulgular Fischer'in tam χ^2 analizini uygulayabilmek amacıyla iki dereceye indirildi ve bu derecelendirme Tablo 5 de gösterildi.

Tablo 4. Deney gruplarındaki histopatolojik bulguların derecelendirilmesi.

	I. Grup				II. Grup				III. Grup				IV. Grup				V. Grup			
Lezyonların derecelendirilmesi	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz
Yok (-)	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	3	5	15	11	5	1	1	1	4
Hafif (+)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3	6	2	3	9	3	2	1	3
Orta (++)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	3	4	1	3	3	-
Şiddetli (+++)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	3	4	6	2	1	2	-
Toplam denek sayısı	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	21	21	21	21	7	7	7	7

Not: (-) işaretli olarak belirtilen satır ve sütünlarda ilgili lezyon görülmediğinden derecelendirme yapılamamıştır.
OHP: Oval hücre proliferasyonu.

Tablo 5. Deney gruplarındaki histopatolojik lezyonların değerlendirilmesi ve karşılaştırılması.

	I. Grup				II. Grup				III. Grup				IV. Grup				V. Grup			
Lezyonların derecelendirilmesi	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz
Yok	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	3	5	15	11	5	1	1	1	4
Var	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	16	6	10	16	6	6	6	3
Toplam de nek sayısı	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	21	21	21	21	7	7	7	7

Not: OHP: Oval hücre proliferasyonu.

Tablo 5 deki değerlere göre istatistiksel olarak yapılan Fischer'in tam x^2 analizinde:

1. Sağlam kontrol (I. grup), PH yapılan (II grup) ve PH yapılan+iron dekstran verilen (III. grup) kontrol grupları arasında lezyonların var oluşu yönünden hiç bir farklılık yoktur ($p > 0.05$). Bu üç kontrol deney grubunda odaksal, nodüler lezyon ve oval hücre proliferasyonu gelişmemiştir. Sadece III. gruptaki üç deney hayvanında fokal nekroz görölmüş olup, bu lezyonun varlığı da bir farklılık getirmemiştir.

2. Tüm kontrol grupları (I., II. ve III. grup) ile PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan (IV grup) sıçan karaciğerlerinde gelişen odaksal lezyonların varlığı yönünde, ileri düzeyde bir farklılık vardır ($p < 0.01$). Üç kontrol grubunda odaksal lezyona rastlanılmamış olup, IV. grupta 18/21 sıçanda odaksal lezyon gelişmiştir.

3. Tüm kontrol grupları (I., II. ve III. grup) ile PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan (IV grup) sıçan karaciğerlerinde nodüler lezyonların varlığı yönünden bir farklılık yoktur ($p > 0.05$). Kontrol gruplarında nodüler lezyon görölmemiştir. IV. grupta 6/21 sıçanda nodüler lezyon gelişmiş olup, görölme derecesi gruplar arasında farklılık göstermemektedir.

4. Tüm kontrol grupları (I., II. ve III. grup) ile PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçan karaciğerinde oval hücre proliferasyonunun varlığı yönünden farklılık vardır ($p < 0.05$). Üç kontrol grubunda da oval hücre proliferasyonu görölmemiş olup, IV. deney grubunda 10/21 sıçanda tespit edilmiştir.

5. Tüm kontrol grupları (I., II., III. grup) ile PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçan karaciğerlerinde fokal nekroz lezyonları yönünden ileri düzeyde bir farklılık vardır ($p < 0.01$). Kontrol gruplarından II. grupta 1/6, III. grupta 3/6 sıçanda fokal nekroz görülmüş olup, IV. grupta ise daha fazla 16/21 sıçanda kaydedilmiştir. Sağlam kontrol grubunda fokal nekroz görülmemiştir.

6. Tüm kontrol grupları (I., II., III. grup) ile PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan ve iron dextran verilen (V. grup) sıçan karaciğerlerinde odaksal ve nodüler lezyonların ve oval hücre proliferasyonunun varlığı yönünden anlamlı düzeyde farklılık vardır ($p < 0.05$). Kontrol gruplarında bu lezyonlar gözlenmemiştir. V. grupta bu lezyonlar 6/7 sıçanda görülmüştür.

7. Tüm kontrol grupları (I., II., III. grup) ile PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan ve iron dextran verilen (V. grup) sıçan karaciğerlerinde fokal nekroz odaklarının varlığı yönünden gözlenen farklılık önemli değildir ($p > 0.05$). II. ve III. kontrol gruplarında ve V. deney grubunda fokal nekroz görülmüştür. I. grupta ise yoktur.

8. PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçan karaciğerlerinde, odaksal ve nodüler lezyonun birbirleri ile görülme derecesi yönünden farklılık olduğu gibi ($p < 0.01$), bu lezyonların oval hücre proliferasyonu ve fokal nekrozun görülme dereceleri ile de arasında farklılık vardır ($p < 0.05$). Odaksal lezyon 18/21, nodüler lezyon 6/21, oval hücre proliferasyonu 10/21 ve fokal nekroz 16/21 sıçanda gelişmiştir.

9. PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan ve iron dextran verilen (V. grup) sıçan karaciğerlerinde, odaksal ve nodüler lezyon, oval hücre proliferasyonu ve fokal nekrozun görülme dereceleri arasında farklılık yoktur ($p > 0.05$). Bu grup sıçanlarda adı geçen lezyonlar birbirlerine benzer miktarlarda gelişmiştir. Odaksal lezyon 7/7, nodüler lezyon 6/7, oval hücre proliferasyonu 6/7 ve fokal nekroz 3/7 sıçanda görülmüştür.

10. IV. ve V. deney gruplarında görülen odaksal lezyon, oval hücre proliferasyonu ve fokal nekrozun gelişme dereceleri yönünden aralarında önemli bir farklılık yoktur ($p > 0.05$). Ancak nodüler lezyonların gelişme dereceleri yönünden farklılık vardır ($p < 0.05$). IV. deney grubunda nodüler lezyon 6/21, V. deney grubunda ise 6/7 sıçanda görülmüştür, yani nodüler lezyon V. deney grubunda daha fazla deney hayvanında gözlenmiştir.

AgNOR SAYILARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

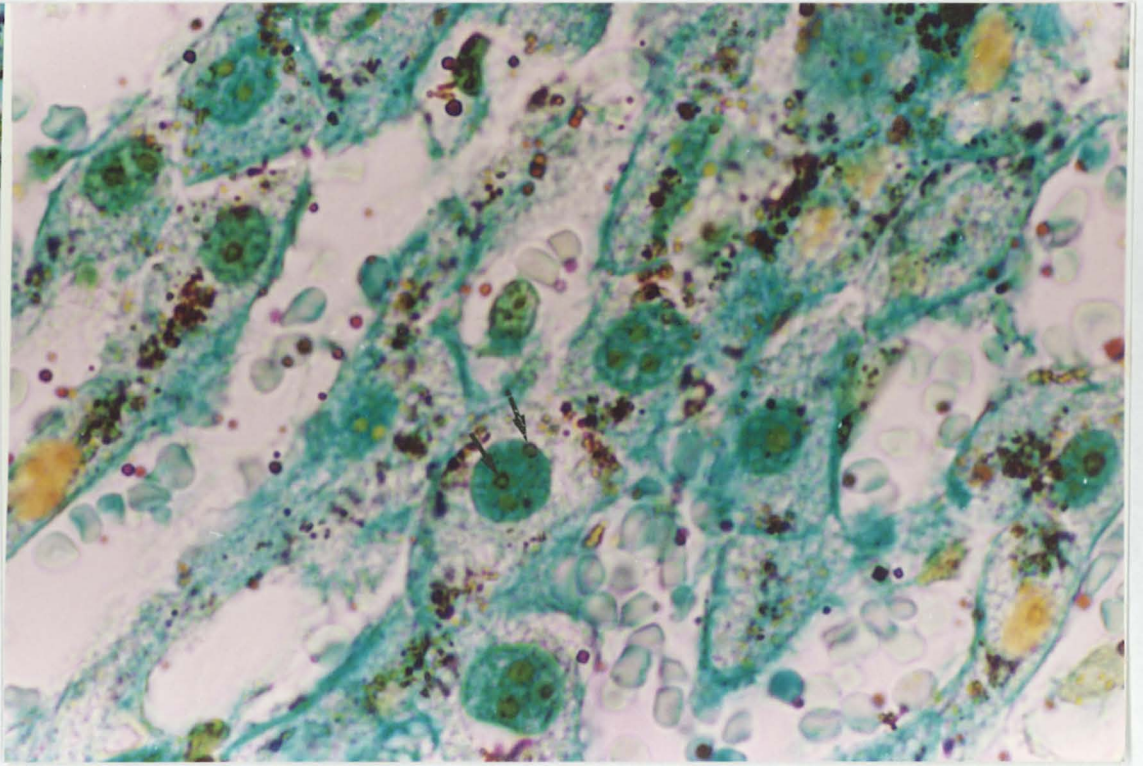
5 grup deney hayvanından I, II ve III nolu kontrol gruplarında lezyon görülmediğinden (II. grupta bir denekte gözlenen odaksal lezyon, ihmal edilmiştir), bu gruplarda tüm karaciğer alanları normal olarak değerlendirilmiştir. Bu üç grup sıçan karaciğerleri ile diğer IV. ve V. grup deney hayvanlarında gözlenen odaksal ve nodüler lezyonlarda ve ayrıca sağlam görünümlü olarak değerlendirilen çevre karaciğer alanlarında yapılan AgNOR sayımının ortalama değerleri ile karşılaştırmaları Tablo 6 da verilmiştir. Tabloda verilenler 20 hücre nüvesinde sayılan AgNOR değerlerinin nüve başına ortalamalarıdır.

Tablo 6. Deney gruplarında nüve başına düşen AgNOR değerlerinin karşılaştırılması.

	I. Grup	II. Grup		III. Grup	IV. Grup			V. Grup		
Denek No.	Sağlam karaciğer	Odaksal lezyon	Sağlam karaciğer	Sağlam karaciğer	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	Sağlam bölge	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	Sağlam bölge
1	2.05	-	3.4	2.3	-	-	1.6	1.3	1.0	1.25
2	2.5	2.2	2.1	2.1	1.9	3.0	1.8	1.45	1.3	1.0
3	2.1	-	2.65	1.8	1.65	1.5	1.9	1.45	1.05	1.01
4	2.3	-	2.4	2.0	1.6	1.8	2.3	1.75	-	2.15
5	2.0	-	2.3	2.2	1.45	-	1.4	1.4	1.5	1.42
6	2.05	-	2.1	2.55	-	-	1.9	1.3	1.05	1.85
7					2.3	2.8	2.3	1.44	1.3	1.15
8					1.35	-	1.5			
9					1.95	-	1.95			
10					2.3	-	2.3			
11					1.65	2.35	2.2			
12					1.95	-	1.5			
13					1.6	-	1.1			
14					1.4	-	1.6			
15					1.4	-	1.75			
16					1.5	-	1.3			
17					1.12	-	1.05			
18					1.6	-	1.15			
19					1.75	1.85	1.4			
20					1.95	-	1.75			
21					-	-	2.2			
Denek sayısı	6	-	6	6	18	6	21	7	6	7
Ortalama	2.17	-	2.49	2.16	1.69	2.22	1.71	1.44	1.20	1.40
St.sap- ma	0.19	-	0.49	0.26	0.32	0.60	0.40	0.15	0.20	0.43
St.hata	0.08	-	0.20	0.11	0.08	0.24	0.09	0.06	0.08	0.16
Karşılaştı- tırma	BC	-	C	BC	AB	BC	A	A	A	A

Not: (-) işaretli olarak belirtilen satırlarda odaksal ve nodüler lezyon görülmemiş ve de değerlendirmeye alınmamıştır.

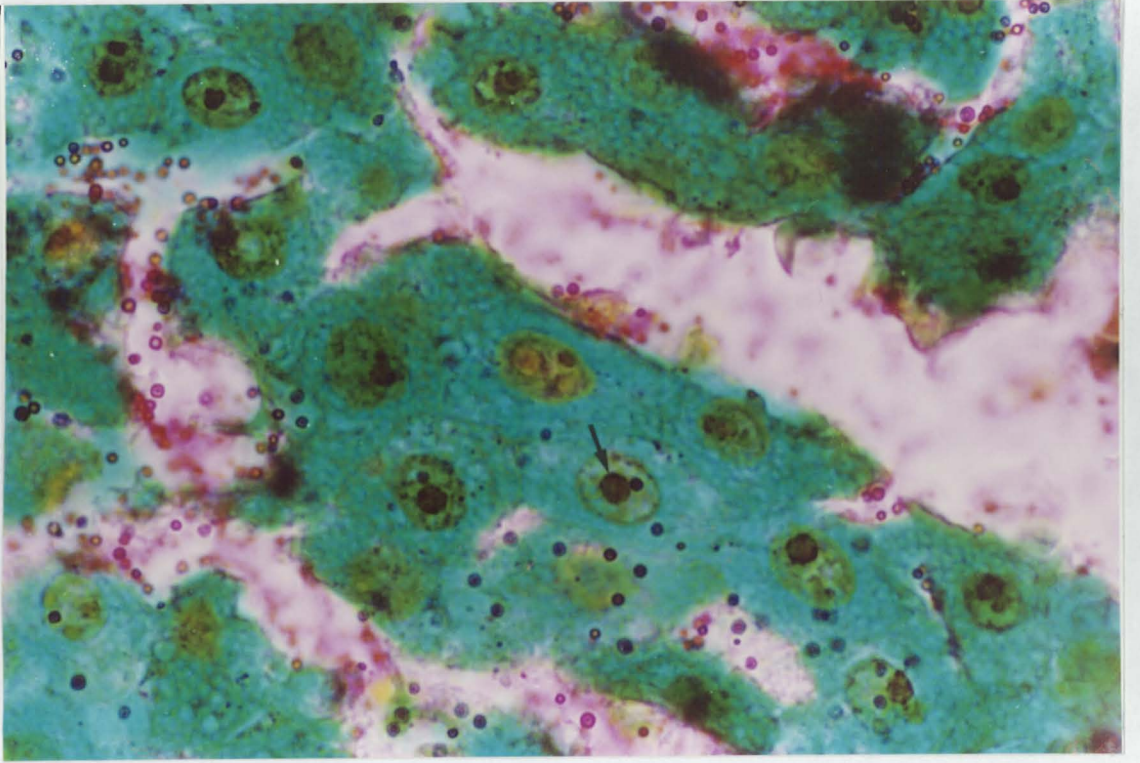
Tablo 6 da gösterildiği gibi, I. sağlam kontrol grubu ve diğer II., III. kontrol gruplarında tek hücre nüvesi başına düşen ortalama AgNOR değerleri I. grupta 2.0-2.5, II. grupta 2.1-3.4 ve III. grupta 1.8-2.55 arasında olup, tüm değerler birbirine yakındır (Resim 20).



Resim 20. Sağlam kontrol grubunda AgNOR noktaları.
AgNOR boyasıxl000

Odaksal lezyonlarda 20 hücrede sayılan ve tek bir hücre nüvesi başına düşen ortalama AgNOR sayısı, IV. grup deney hayvanlarının karaciğer hücrelerinde 1.12-2.3,

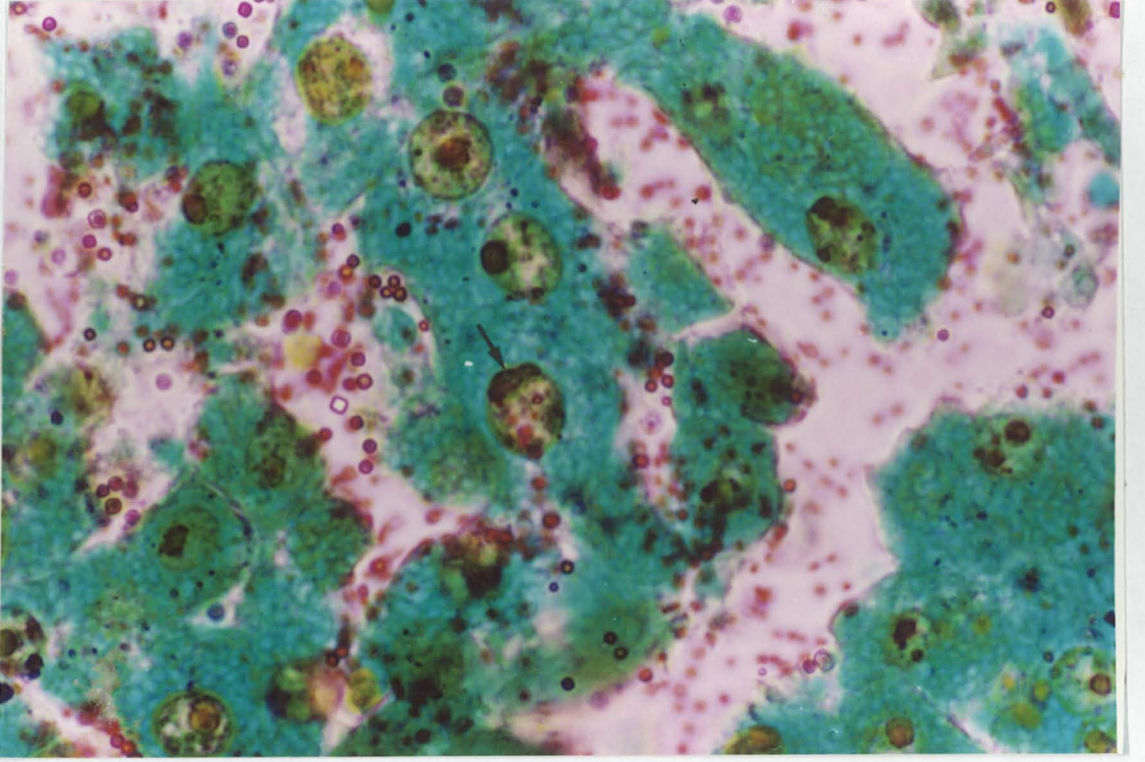
V. gruptaki deney hayvanların da ise 1.3-1.75 değerleri arasında idi (Resim 21).



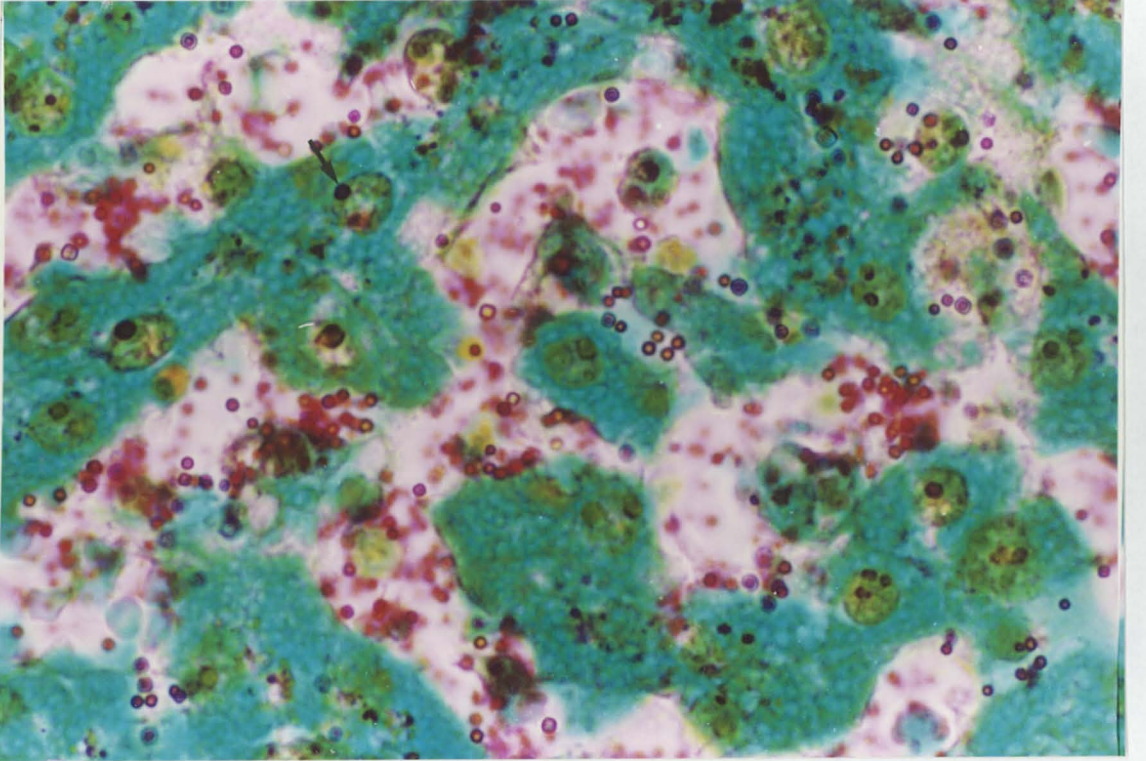
Resim 21. Odaksal lezyonlardaki AgNOR noktaları.
AgNOR boyasıx1000

Nodüler lezyonlarda ortalama AgNOR sayısı IV. grup deney hayvanlarının karaciğer hücrelerinde 1.5-3, V. gruptaki deney hayvanlarında ise 1-1.5 değerleri arasında idi (Resim 22). Odaksal ve nodüler lezyonlardaki AgNOR değerleri V. grupta, IV. gruba göre düşüktür.

IV. ve V. deney gruplarında sağlam görümlü karaciğer alanlarında nüve başına düşen ortalama AgNOR sayısı IV. grupta 1.05-2.3, V. grupta 1-1.5 değerleri arasında olup, V. grupta IV. gruba göre daha düşüktür (Resim 23).



Resim 22. Nodüler lezyonlardaki AgNOR noktaları.
AgNOR boyasıx1000



Resim 23. Sağlam görünümlü alanlardaki AgNOR noktaları. AgNOR boyasıx1000

Tablo 6 da verilen deney gruplarındaki nüve başına düşen ortalama AgNOR değerlerinin, istatistiksel olarak yapılan tek yönlü varyans analizinde, bazı gruplar arasında grup ortalamaları yönünden önemli düzeyde fark vardır ($p < 0.001$).

Tüm grupların AgNOR değerlerinin birbirleriyle yapılan karşılaştırmasında:

1. Sağlam kontrol (I. grup), PH yapılan (II. grup) ve PH yapılan, iron dextran verilen (III. grup) sıçan karaciğerlerinde sayılan ortalama AgNOR değerleri birbirlerinden tamamen farklı değildir.

2. Sağlam kontrol (I. grup) ile PH yapılan ve iron dextran verilen kontrol grubu (III. grup) ve PH yapılan 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçanlarda görülen nodüler lezyonlardaki ortalama AgNOR sayıları arasında önemli düzeyde bir farklılık yoktur. IV. grup odaksal lezyonlarındaki AgNOR değerleri ise bu değerlere tam bir benzerlik göstermemekle beraber, aralarındaki farklılık önemli değildir.

3. Sağlam kontrol (I. grup), PH yapılan (II. grup), PH yapılan ve iron dextran verilen (III. grup) kontrol grupları ile PH yapılan, 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçanlardaki nodüler lezyonlarda sayılan ortalama AgNOR değerleri, diğer V. grup sıçanlardaki lezyonlu ve sağlam görünümlü alanlarda ve de IV. grup deney hayvanlarının sağlam görünümlü alanlarındaki ortalama AgNOR değerlerinden önemli düzeyde farklıdır.

4. PH yapılan kontrol grubu (II. grup) ortalama AgNOR değerleri, IV. grup deney hayvanlarının sağlam görünümlü alanları, odaksal lezyon içeren alanları ve V. grup deney hayvanlarının odaksal ve nodüler lezyon ve sağlam görünümlü alanlarında sayılan AgNOR değerlerinden tamamen farklıdır. II. kontrol grubunun ortalama AgNOR değeri ile IV. grubun nodüler lezyonundaki değerler tamamen farklı değildir.

5. PH yapılan ve 2-AAF içeren diet alan (IV. grup) sıçanlarda görülen odaksal lezyonlardaki AgNOR değerleri ile PH yapılan 2-AAF içeren diet alan ve iron dextran verilmiş olan (V. grup) sıçanlarda odaksal ve nodüler lezyon, sağlam görünümlü alanlarda sayılan ortalama AgNOR değerleri arasında önemli bir farklılık yoktur. IV. grubun nodüler lezyonu AgNOR değerleri V. grubun tüm sahalarındaki AgNOR değerlerinden önemli düzeyde farklıdır, yine IV. grubun sağlam görünümlü alanlarındaki ortalama AgNOR değerleri V. grubun tüm ortalama AgNOR değerleri ile tam bir benzerlik göstermektedir.

6. IV. grup deney hayvanlarında AgNOR sayımı yapılan üç farklı alandaki ortalama değerler ortak özellikler taşımakla birlikte, odaksal lezyonlar ile sağlam görünümlü alanlardaki değerler arasında tam bir benzerlik yoktur. Nodüler lezyondaki ortalama AgNOR değeri sağlam görünümlü alandan önemli düzeyde farklılık göstermektedir.

7. V. grup deney hayvanlarında farklı alanlarda yapılan sayımda ortalama AgNOR değerleri birbirlerine tam bir benzerlik göstermektedir.

T A R T I Ŗ M A

Sıçanlarda, karaciğere ait malign neoplazmların gelişimi sırasında, öncül olduğu düşünölen çeşitli ve birbirlerinden farklı hücresel lezyonlar gelişir. Hepatoselölüler kanser prekürsörü olarak değeriendirilen lezyonlar arasında "oval hücre proliferasyonu", "odaksal (hiperplastik) lezyonlar" ve "hiperplastik (neoplastik) nodüller" yer almaktadır (8).

Risk taşıyan ya da risk altında olan dokularda, spontan veya artifisyel olarak kanser gelişiminde, biyokimyasal, ströktürel ve organizasyon yönünden değışen yeni bir hücre popölasyonunun ortaya çıkışı, karsinogenezisin tek basamaklı olmadığının bir kanıtıdır. Bu yeni lezyonlar karakteristik olarak gelişigüzel dağılımlı ve fokaldir, bu da hedef hücrelerin sadece bir kısmının olaya katıldığını düşöndürmektedir. Malignensinin habercileri ve öncülleri olarak kabul edilen bu odaksal lezyonların, belirli histolojik varyantları, sıklıkla "preneoplastik veya premalign" olarak sınıflandırılmaktadır (32,39).

Preneoplastik hepatosellölüler odaksal lezyonlarda enzim aktivitelerinde azalma, artma veya normal dışı en-

zimlerin ortaya çıkışı, aşırı glikojen depolama, hücre-
sel demir birikiminde noksanlık ve metabolize edilmesi
gereken toksinlerin sitotoksik etkilerine direnç gelişi-
mesi gibi bazı fenotipik değişikliklerin oluştuğu bilin-
mektedir. (7,8,11-13,32).

Sıçan karaciğerinde, karsinojen verilmesi sırasın-
da, hepatokarsinogeneze yönelik olarak yapılan çalış-
malarda odaksal, nodüler lezyonlar ve karsinom alanları-
nı belirlemek üzere, bu lezyonlarda, çeşitli çalışmalar-
da gözlenmiş olan değişik fenotipik özelliklerden yarar-
lanılmaktadır. Bunların arasında bu lezyonlardaki demir
birikiminde azalma özelliği literatürde belirtildiği gi-
bi en duyarlı ve güvenilir gösterge araçlarından biridir
(11,13,37). Bu çalışmada da karsinojen verilmek suretiy-
le oluşturulan lezyonları göstermek üzere bir demir pre-
paratı olan iron dextran kullanılmıştır. Karsinojen veri-
len V. deney grubunda iron dextran ile deneysel hemosi-
derozis oluşturulmuş, odaksal ve nodüler lezyonlarda,
çevre parankim dokusuyla karşılaştırıldığında demir tu-
tulumunun olmadığı ya da hücre sitoplazmalarında çok da-
ha az oranda birikme özelliği gösterdiği kaydedilmiştir.
Parsiyel hepatektomi yapıp, iron dextran verilmiş olan
III. kontrol deney grubu sıçanlarda yüklenen demirin tüm
hepatositlerde aynı oranda tutulduğu görülmüştür (Resim
16-19).

Hepatokarsinogenezis sırasında gelişen odaksal
lezyonlar, karsinojenlerin, örneğin 2-AAF nin mitozu in-
hibe edici etkilerine ve metabolizması gereken sitotok-
sik ajanların nekrojenik etkilerine dirençlidir (9).
Haddow ve ark. karsinojenlerin etkilerini, seçici bir

toksinite ile ve rezistan bir populasyon oluşmasına izin vererek başlatabileceği kavramını desteklemektedir. Böyle bir populasyonun önceden var olan hücrelerin proliferasyonu ile mi, yoksa baştan beri karsinojenle oluşturulan yeni bir hücre populasyonu sonucu mu geliştiği konusu, yani kimyasal karsinogenezis esnasında gelişen preneoplastik subpopulasyonun hücresel orijini henüz tam olarak açıklanabilmiş değildir (9,13). Bununla birlikte, 1982 de Rabes ve ark. nın fare karaciğerinde enzim eksikliği gösteren preneoplastik hücre populasyonunda yaptığı bir çalışmada, odaksal lezyonların, değişime uğramış olan hücrelerin, aynı özellikteki hücreleri oluşturduğu klonal bir büyüme sonucu geliştiğini destekleyen bulgular ortaya konmuştur (46). Büyüme derecesi hücrelerin fenotipik özelliklerinin karmaşıklığı ile ilişkilidir (3).

Odaksal lezyonların biyolojik davranışlarına yönelik olarak öne sürülen bir görüş de, bu lezyonların nodüllere (adenom) veya karsinomlara gelişme potensine sahip olduklarıdır (8,10). Odaksal lezyonlarda büyümenin devamlı olması sonucu, bir kısmının nodüler lezyonlara dönüştüğü düşünülmektedir (8,9,10,11).

Nodüler lezyonların odaksal lezyonlardan geliştiği düşüncesi, her iki lezyonda da aynı fenotipik özellikleri gösteren hücrelerin görülmesine dayanmaktadır. Rutin hematoksilin eozin ile boyalı kesitlerde neoplastik nodüllerde 4 tipte hücre görülebilir:

- a) Clear hücreler,
- b) Asidofilik hücreler,
- c) Vaküollü hücreler,
- d) Bazofilik hücreler.

Bu 4 tip hücre, kullanılan kimyasal maddenin cinsine bağlı olmaksızın neoplastik nodüllerde görülebilmektedir. Hepatokarsinogenezis sırasında erken dönemde clear ve asidofilik hücreler gözlenmekte olup, geç dönemlerde ise bu hücreler arasında yağ depolayan, intermediate veya bazofilik hücreler görülebilmektedir. Neoplastik nodüllerde de morfolojik olarak bu hücrelere benzer hücrelerin görülmesi nodüllerin clear ve asidofilik hücrelerden geliştiğini desteklemektedir. Geç dönemlerde ve neoplastik nodüllerde belirgin olarak gözlenen hücresel heterojenite, clear ve asidofilik hücrelerdeki glikojen içeriğinin azalması ve ribozomlardaki artış ile açıklanmaktadır. Elektron mikroskopunda da, asidofilik hücrelerin agranüler membranlarının genellikle glikojen azalması sırasında ribozomların artışı nedeniyle granüler membran yapısına dönüştüğü gözlenmiştir. Glikojenden fakir olan bazofilik hücrelerin, HCC'de yaygın olarak görülen hücrelere morfolojik olarak benzemesi nedeniyle, bazı yazarların bu hücre tipinin neoplaziye giden son basamak olduğu düşüncesini taşıdıkları bildirilmektedir. Bannasch isimli araştırmacı da tamamen bazofilik hücreler içeren nodüllerin aslında karsinom alanları oldukları görüşündedir (14).

Williams, neoplastik nodüllerin biyolojik olarak önemini belirlemek üzere, bu lezyonlardaki hücrelerin hücre kültürleri, soft agar ve transplante edildikleri ortamda büyüme davranışlarını incelemiştir. Kültür çalışmalarında, hücrelerin yaşam sürelerinde normal hücrelere göre bir farklılık olmadığını, transplante edildikleri ortamda ise aylarca kalıcı olduklarını görmüştür. Nodül hücreleri otonom bir büyüme göstermemiştir. Buna

karşılık, aynı çalışmada, kanser hücrelerinin düzenli bir büyüme davranışı içerisinde olduklarını görmüştür. Bu sonuçlar, nodüllerin in situ bir çevrede, yani karaciğer ortamında büyüyebileceği fikrini çürütememektedir (9).

Nodüller gerileyebilir (37). Williams tüm nodüllerin karsinoma gelişmediklerini düşünmektedir. Nodüller içerisinde ve de yanı sıra nodül dışı odaklarda karsinom yönünde değişiklikler saptayarak, karsinom gelişimi için nodüllerin zorunlu olmadığı görüşünü ileri sürmüştür (9). Reuber isimli araştırmacı da nodüllerde küçük karsinomlar gelişebileceğini öne sürmektedir (16).

DNA mikrospektrofotometrik çalışmalarda odaksal lezyon, nodüller ve karsinomların hücrelerindeki DNA içeriğinin bazı özellikler gösterdiği görülmüştür. Eozinofilik odaklar ve nodüllerin DNA içerikleri değişken olarak saptanmışken, hiperbazofilik odaklarda karsinomlara benzer şekilde DNA'nın aneuploid özelliğinde olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, eozinofilik odakların nodüllere, bazofilik odakların karsinomlara gelişebileceği söylenebilir denilmektedir (8). Yine [^3H] thymidin ile yapılan otoradyografi tetkikinde, sıçan karaciğerinde preneoplastik enzim değişimi olan odaklardaki hücrelerin aktiviteleri araştırılmış ve bu çalışma da odaklarda, çevre dokular veya sağlam kontrol karaciğer parankimi ile karşılaştırıldığında, hücre proliferasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu verilere dayalı olarak bu lezyonların fokal hepatosellüler proliferatif lezyonlar olarak adlandırılması önerilmiştir (9).

1974 de, "karaciğerde preneoplastik lezyonların natürü ve isimlendirilmesi" konulu toplantıya katılanların çoğu da bu lezyonların proliferatif lezyonlar olduğu kanısında fikir birliğine varmışlardır (34).

Sıçan ve diğer kemirici karaciğer hücreleri, farklı nüve ve kromozom sayısı taşıma özelliğindedir. Bu nedenle yaşla ilgili olan veya rejenerasyon, hiperplazi ve neoplazi gibi durumlarda gelişecek hücresel değişikliklerin açık bir şekilde görülmesi ve algılanması zordur. Adult sıçanlara sürekli DNA reaktif karsinogenler verilmesi ile hücre nüvelerinde 4N/2N oranının bir kaç haftada düştüğü ve bu cevabın doz kesildikten sonra değişmediği görülmüştür. İmmatür farelerde ise karsinogen ile poliploidizasyonda artış olduğu dikkati çekmiştir. Gözlemciler, tümör hücre kromozomlarının diploid olduğu konusunda aynı düşüncededirler. 2/3 PH yi takiben oluşan rejenerasyon halindeki karaciğer hücrelerinde 4N/2N oranında artış, ancak iki nüvelilik oranında bir değişiklik için olmadığı görülmüştür. Genotoksik karsinogenler verildiğinde iki nüveli hücre sıklığında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (47). Biz de PH yapılan ve genotoksik olan 2-AAF verilen deney hayvanlarında iki ya da çok nüveli hücrelere pek rastlamadık.

Williams'ın bir çalışmasında da, 2-AAF ile oluşturulan odaksal lezyonlardaki hücrelerde iki nüveli olma düzeyi düşük olarak gözlenmiş, proliferen olan hepatositlerde de aynı özellik saptanmıştır.

Hücre proliferasyonu, temel bir biyolojik süreçtir ve onun direk ya da indirek olarak değerlendirilmesi histopatologlar için önemlidir. Doku kesitlerinde proli-

fere olan hücrelerin belirlenmesi, mitoz sayısının değerlendirilmesini gerektirmekte veya pahalı olan ve zaman alıcı diğer yöntemlerle, örneğin, otoradyografik veya flow sitometrik metodların kullanılması ile mümkün olabilmektedir. Mitoz hücre siklusunun sadece küçük bir bölümü olduğundan sayımının yapılabilmesi güç olabilmektedir (42). Yaptığımız çalışmada, biz de lezyon alanlarında az sayıda mitoz görebildik.

Literatürde, 2-AAF verilerek yapılan bir çalışmada, erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda ağırlık kaybı olduğu kaydedilmiştir (31). Yaptığımız bu çalışmada da, kullandığımız sıçanlarda sağlam kontrol ve diğer PH yapılan kontrol grupları ile karsinojen yani 2-AAF verilen IV. ve V. deney grubu hayvanlarının vücut ve karaciğer ağırlıklarının birbirlerinden farklı olduğunu gördük. Yapılan istatistiksel karşılaştırmada da bu farklılık anlamlı idi ($p < 0.001$). Biz IV. ve V. deney grubu sıçanlarda vücut ve karaciğer ağırlıklarının kontrol gruplarına göre düşük olmasını, bu iki gruba karsinojen olarak verilen 2-AAF e bağladık. Sıçanların büyümesini etkileyebilecek herhangi bir açıklamaya literatürde rastlayamadık. Ancak lezyonların sitotoksik ajanlara direnç gösterdikleri ve bu nedenle proliferatif özelliklerini korudukları literatürde belirtilmekle birlikte, karsinojenlerin ve özellikle 2-AAF in normal parankim hücreleri üzerinde mitotik aktiviteyi inhibe ettiğini de bilmekteyiz (8,9,16).

Hepatokarsinogenezis çalışmalarında, preneoplastik lezyonların gelişimini hızlandırmak üzere kullanılan metodlardan biri de parsiyel hepatektomidir. Ayrıca fenobarbütal ve kolinden yoksun diet de olayı çabuk-

laştırıcı rol oynayabilmektedir (8,9). Biz, bu çalışmada 2/3 PH yaparak karaciğerde bir rejeneratif (proliferatif) aktivite oluşturduk. Ardından 3. gün genotoksik bir karsinogen olan 2-AAF içeren diet başlandı. 5. ay sonunda, karsinogen verilen ve değerlendirmeye alınan IV. gruba ait 16 sıçanda 10 luk büyütme ile 10 sahada 1.03-43.6, V. grupta ise 7 sıçanda aynı ölçümleme ile 0.6-17 arasında değişen miktarlarda odaksal lezyon geliştiğini tespit ettik. İstatistiksel olarak da bu iki deney grubunda lezyonların gelişim dereceleri yönünden farklılık yoktu ($p > 0.05$). Nodüler lezyonların ise IV. deney grubunda, 10 luk büyütme ile 10 sahada 0.3-5 adet iken V. deney grubunda 0.3-2.6 adet arasında ki değerlerde geliştiğini gördük. İstatistiksel olarak yapılan Fischer'in tam x^2 analizinde bu iki grup arasında nodüler lezyonların gelişim dereceleri yönünden farklılık saptadık ($p < 0.05$). Hafif düzeydeki bu farklılığı biz V. gruptaki denek sayısının az olması nedeniyle ortaya çıkan istatistiksel bir yanılğı olarak yorumladık. IV. deney grubunun kendi arasında odaksal, nodüler lezyon ve oval hücre proliferasyonu ile fokal nekroz gelişim dereceleri yönünden istatistiksel bir farklılığın görülmesi, bu lezyonların birbirlerinden bağımsız olarak geliştiklerini ifade etmekle beraber, V. deney grubunda bu açıdan yapılan istatistiksel değerlendirmede belirgin bir fark bulunmayışı bu düşüncemize ters düşmekte ve lezyonların ortaya çıkışında bir ilişki olduğunu telkin etmektedir. Bu farklı bulgumuzdan birincisi, nodüler lezyonların odaksal lezyonlardan gelişmeyip, direk olarak da gelişebileceğini göstermektedir. IV. grup sıçan-

larda gelişen nodüler lezyon sayısının odaksal lezyonlardan az sayıda oluşu tüm odaksal lezyonların da nodül formasyonuna dönüşmediğinin bir ifadesi olabilir . İkinci sonuç ise nodüler lezyonların odaksal lezyonlardan gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada odaksal lezyon gördüğümüz karaciğerlerin tümünde, nodüler lezyon saptamadığımız halde, nodüler lezyonu bulunan tüm karaciğerlerde beraberinde odaksal lezyonların da bulunması, lezyonların birbirleriyle ilişkili olduklarını ve de nodüler lezyonların odaksal lezyonlardan geliştiğini destekler mahiyettedir. Ayrıca her iki lezyonda da aynı hücresel nitelikleri saptamamız bu gözlemimizin en önemli delilidir. Çalışmamızda odaksal lezyonlar, genellikle, asidofilik ve buzlu cam görünümünde sitoplazmaya sahip, nüveleri iri ve veziküler, iri eozinofilik nükleolusları belirgin hepatositlerden oluşmakta idi, bu hücrelerin aralarında bir kaç sığanda sitoplazması daha bazofil boyanmış hücrelerde gözlemlendi. Yine aynı deneklerde oluşan nodüler lezyonlarda orta sahalarda, çoğunlukla bazofil sitoplazmalı hücreler ile dışta asidofilik sitoplazmaya sahip hücrelerin görülmesi, nodüler lezyonların asidofilik hücrelerden gelişmiş olabileceğini düşündürmüştür (Resim 11). Bu bulgu, literatürde belirtildiği gibi (14), nodüllerdeki bazofilik hücrelerin zaman içerisinde glikojenden fakir, ribozomdan zengin hale gelen asidofilik hücrelerden geliştiğini de desteklemektedir.

Tüm kontrol gruplarına ait sıçanlarda (I., II., III. grup) II. gruptaki bir denekte gözlenen odaksal lezyon dışında herhangi bir lezyona rastlanmamıştır. Bu

nedenle, kontrol grupları ile IV. ve V. deney gruplarında görülen tüm lezyonların görülme dereceleri açısından yapılan Fischer'in tam x^2 analizinde aradaki fark önemli olarak kaydedilmiştir.

IV. ve V. deney gruplarındaki lezyonlar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada nodüler lezyon dışındaki lezyonlar arasında bir farklılık görülmemesi V. deney grubunda kullanılan, iron dextranın önemli bir farklılığa neden olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. V. deney grubunda nodüler lezyonların daha büyük oranda ortaya çıkışında iron dextranın etkisi olmadığı düşüncesindeyiz, çünkü deney bitiminden önceki 15 gün içerisinde kullanılmıştır. Nodüler lezyonların gelişimi ise karsinogenezin geç dönemlerinde olabilmektedir.

Oval hücre proliferasyonu, preneoplastik lezyonlar arasındadır. Bu hücrelerin orijini, biyolojik davranışları ve gelişim süreçleri uzun zamandır tartışılan bir konudur. Hepatokarsinogenezisin erken dönemlerinde göze çarpar. Çeşitli karsinojenlerle ve özellikle de amino azo boyaları ve aromatik aminlerle yapılan çalışmalarda görülür (8). Oval hücrelerin, α -fetoprotein salgılayan tümörlerin gelişiminden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (6). 2-AAF alan sıçanlarda da geliştiği gözlenmiştir (6,15,35). Bu hücrelerin karaciğer neoplazmlarının öncülü olduğu düşünülmeyle birlikte, hepatokarsinogenezisin gelişimindeki önemi bilinmemektedir (8).

Çalışmamızda oval hücre proliferasyonu, sadece karsinojen alan IV. ve V. deney gruplarında görüldü. Kontrol gruplarında gözlenmedi. IV. ve V. deney gruplarında görülme dereceleri yönünden istatistiksel olarak

bir farklılık görülmedi ($p > 0.05$). Bu bize V. gruba verilen iron dextranın bu lezyon üzerinde etkisinin olmadığını göstermektedir.

Histolojik kesitlerde oval hücrelerin çoğunlukla periportal sahalarda olup, bazı alanlarda sinüzoidler boyunca uzanarak lobüller içerisine ilerledikleri görüldü. Bazı alanlarda ise lümene benzer boşlukları çevreledikleri ve de yer yer hepatositlerin etrafını sardıkları izlendi. Bu histopatolojik bulgular literatür ile uyumludur (36).

Karsinojenlerin çoğu nekroza neden olur. 2-AAF minimal doku reaksiyonu oluşturma avantajına sahiptir. Bu nedenle dokuda oluşabilecek nonspesifik değişiklikler görülmemektedir (48).

Kontrol grupları (I., II. ve III. grup) ile IV. ve V. deney grupları arasındaki fokal nekroz miktarı yönünden yapılan Fischer'in tam x^2 analizinde görülen farklılığın ($p < 0.01$), IV. ve V. deney gruplarında kullanılmış olan 2-AAF ve iron dextrana bağlı olarak geliştiği düşünülmekle birlikte, her iki grubun fokal nekroz yönünden yapılan karşılaştırmasında fark olmayışı bu bulgunun doğrudan 2-AAF nedenli ortaya çıkışını gösteriyor olabilir. Ancak III. grupta 3 denekte fokal nekroz görülmesi iron dextranın da bu yönde bir etkisi olabileceğini akla getirmektedir.

Ribozomal genler, DNA üzerindeki metafaz kromozomlarında yer alan nükleolar organizasyon region (NOR) olarak isimlendirilen alanlarda lokalizedir (44,49). Bu lokalizasyon alanları in situ hibridizasyon (22,49) veya NOR gümüşleme boyası ile tanımlanabilir. NOR lar

spesifik asidik proteinlerle ilgilidir ve gümüşleme boyası ile siyah noktalar şeklinde görülürler (43,45,50-53).

Aktif NOR nükleolusta görülür, inaktif NOR lar ise nükleolus dışında bulunabilmektedir (51). NOR lar ribozomal DNA segmentleri olup, ribozom ve protein yapımı ile ilişkilidir (41,43,50,52). NOR-DNA, RNA polimeraz I tarafından transkribe edilen ribozomal RNA (rRNA) genlerine sahiptir (43-45,53). Argirofil moleküllerin RNA polimeraz I, C₂₃ protein ve C₂₃ e benzer, ancak daha küçük boyutlarda diğer moleküllerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (43,44,50). NOR lar rDNA nın transkripsiyonunu regüle ettiklerinden veya DNA zincirinin boyutunu değiştirdiğinden, nükleer ve sellüler aktivitesini belki de transformasyon durumunu ve de malignensi-yi gösterdiği düşünülmektedir (22,42,43,50,53). Ayrıca hücrenin kromozom sayısını (44,50) ve de replikasyonunu göstermede yararlı olabileceği bildirilmektedir (53).

NOR ların gümüşleme boyama tekniği ile gösterilmesi, tümör biyolojisi çalışmalarında ilgi alanı içerisindedir (22). Literatürde AgNOR sayılarının hücresel proliferasyon ile yakından bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (22,42). Hücre proliferasyonlarının diğer yöntemlerle ölçümleri ile AgNOR sayıları arasında direk ya da indirek olarak korelasyonun bulunduğu da bildirilmektedir (22).

AgNOR un yerleşimi ve dağılımı normal ve tümöral hücrelerde yapılan kromozomal çalışmalarda önemli olduğu gibi, sayı ve boyutları da histolojik yaklaşımlar yönünden önemli faktörlerdir. Crocker ve ark. nın kullandıkları metod, lenf nodlarının, cilt tümörlerinin ve

memenin benign, malign, hiperplastik lezyonları ve normal yapıları karşılaştırılmak üzere kullanılmaktadır. Bu durumlarda AgNOR noktalarının nüve içerisindeki sayıları farklıdır. Meme karsinomlarında AgNOR sayılarının geniş bir yayılım gösterdiği ve anaplastik grup lezyonlarının bir kısmında ise düşük sayımlar olduğu görülmüştür. Meme de kaydedilen bu bulgular ribozomal RNA genlerinin hormonlarla regüle olabildiği düşünülmüşse pek de şaşırtıcı olmamalıdır denilmektedir (22).

Diğer bir konu AgNOR sayılarının tümör davranışları ile ilgili bir gösterge olup, olmayacağıdır. Örneğin düşük AgNOR sayımına sahip anaplastik tümörler beklenenden daha iyi prognoz gösterebilirlermi sorusunu getirmiştir. Eğer NOR proteinlerinin gümüş boyası diagnostik histopatoloji de kullanılacak ise benign ve malign lezyonların ayırımından başka borderline (sınır) lezyonların davranışı konusunda da yararlı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, borderline over tümörleri, atipik duktal hiperplazi ve intraduktal karsinomun karşılaştırılması, ülseratif kolitte displazinin değerlendirilmesi gibi (22). Tümörler farklı davranışlar içerisinde olduğundan ve fonksiyonel olarak da farklılık gösterdiğinden ortalama AgNOR değerlerindeki değişiklikler şaşırtıcı değildir (22).

Literatürde yapılan çalışmalarda benign lezyonlarda AgNOR noktalarının nüve içerisinde dağılımları regüler ve az sayıda olduğu, malign lezyonlarda ise irregüler dağılımlı ve sayıca çok oldukları belirtilmektedir (43,45,50-53). Ancak NOR aktivitesi hücre tipine ve diferansiyasyon evresine göre değişir (54). Ne total AgNOR

sayıları, ne de kümeleri mitotik sayımlar ile bağlantılı değildir (52).

Karsinogenezisde kullanılan genetik karsinojenler hücre DNA sı üzerinde mutasyon oluşturmaktadır. Bununla ilgili olarak hücrede bazı fenotipik değişiklikler geliştiği bilinmektedir (7,8,11-13,32).

Karaciğerde kimyasal karsinogenezis sırasında gelişen preneoplastik ve neoplastik lezyonların proliferatif lezyonlar olduğu düşünülmektedir. AgNOR sayılarının hücresel aktivite ve proliferasyon ile yakından bağlantılı olduğu düşüncesinden hareket ederek çalışmamızda oluşturduğumuz preneoplastik lezyonlarda AgNOR sayılarını değerlendirdiğimizde yapılan istatistiksel tek yönlü varyans analizinde: Sağlam kontrol grubu ile PH yapılan II. grup ve PH yapıp, iron dextran verilen III. kontrol gruplarında nüve başına düşen ortalama AgNOR sayıları arasında benzerliğin bulunması karaciğerin kendisini fonksiyonel ve organik olarak tamamladığının ifadesidir. Ayrıca III. gruba iron dextran verilmesi de nüve başına düşen ortalama AgNOR sayısına farklılık getirmemiştir. Her üç kontrol gruplarındaki ortalama AgNOR sayısı 2.16 ve üzerindedir. Tüm kontrol gruplarında sayılan ortalama AgNOR değerleri, IV. grubun nodüler lezyonu dışında, bu grubun odaksal ve sağlam görünümlü alanları ile V. grupta değerlendirilen tüm odaklarda sayılan ortalama AgNOR değerlerinden istatistiksel olarak farklı olup yüksektir.

Deney gruplarındaki IV. ve V. grupların AgNOR değerlerinin düşük oluşu ise şöyle açıklanabilir: Bir çalışmada % 93.2 oranında asidofilik hücrelerden oluş-

muş odaksal lezyonlarda, lezyonlu olmayan karaciğer hücrelerine oranla tek nükleolusa sahip hücre oranının arttığı, merkezden uzak marjinal yerleşimli nükleolus oranının azaldığı belirtilmektedir. 3' metil, 4 dimetil-aminoazobenzen ile beslenen hayvanlarda marjinal nükleolus sayısında azalma olduğu gözlenmiş ve bunun stoplazmaya azalan ribozom transferi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (11). Biz de 2-AAF verilen IV. ve V. deney gruplarındaki düşük ortalama AgNOR değerlerinin sitoplazmaya azalan ribozom transferi ile bağlantılı olabileceğini düşünmekteyiz. Ribozom transferi üzerindeki bu etkiyi de hücre nüvelerindeki ribozomal RNA genlerinde karsinojen nedenli olabileceğini varsaydığımız bazı değişikliklere bağladık. Çünkü IV. ve V. gruplarındaki odaksal ve nodüler lezyonlar asidofilik, sitoplazmaya ve genellikle ortada ve tek nükleolusa sahip hücrelerden oluşmakta idi.

IV. ve V. deney gruplarında odaksal ve nodüler lezyonlar ile sağlam görünümlü alanların, her grupta kendi içerisinde ve de iki grup arasında birbirleriyle karşılaştırıldığında AgNOR değerleri yönünden benzerlik vardır. Sağlam görünümlü alanlar ile odaksal lezyonlar arasında farklılık beklendiği halde, AgNOR değerlerinin istatistiksel ve de sayısal olarak kısmen ya da tam bir benzerlik göstermesi bunların hücresel aktivite yönünden birbirleriyle pek farklı olmadıklarını düşündürmektedir. Yani karsinojen madde histolojik olarak normal değerlendirilen hepatositlerin aktivitesini de etkilemiş olabilir.

Sağlam kontrol ile PH yapılan ve 2-AAF verilen IV. deney grubunun nodüler lezyonlarındaki ortalama AgNOR değerleri istatistiksel olarak benzerlik göstermektedir. Ancak bu nodüler lezyonlardaki nüve başına düşen ortalama AgNOR sayısı IV. deney grubunun diğer alanlarından ve V. deney grubunun tüm AgNOR değerlerinden yüksektir. Beklenmeyen bu bulgu IV. deney gruplarındaki nodüler lezyonlarda 2.7 ve 11 nolu deneklerde AgNOR sayısının yüksek olması ve ortalamayı yükseltmesi ile ortaya çıkmıştır. Bu yüksek değerler 2.7 ve 11 nolu deneklerin nodüler lezyonlarında bazofilik hücrelerin varlığı ile ilgili olabilir imajını vermektedir. Çünkü literatürde (11,14,32) bildirildiği üzere bazofilik hücre odaklarında ribozomlar artmıştır.

Sonuç olarak; biz yaptığımız bu çalışmada IV. deney grubunda 2-AAF verilerek oluşturulan lezyonlar içerisinde bazofilik hücre taşıyanlarda AgNOR değerlerinin arttığını tespit ettik. Literatürde belirtildiği gibi, bazofilik hücrelerin bazı yazarlarca karsinom gelişiminde son basamak oldukları ve bazılarına göre (14) de aslında karsinom alanları şeklinde yorumlandıkları düşünüldüğünde, bu çalışmada bazofilik hücreleri içeren nodüler lezyonlarda AgNOR değerlerinin yüksek oluşu neoplastik bir transformasyonun göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu bulgumuz, yine malign transformasyonlarda artan AgNOR değerlerinin ortaya konduğu çalışmaların sonuçları ile de paralellik göstermektedir. Preneoplastik lezyonlar, neoplastik yapısı olmayan, fenotipik olarak değişen hücre popülasyonu olarak tanımlanmıştır (32). Bu çalışmada sitoplazmik değişikliklerin dışında asidofilik hücreler-

den oluşan odaklardaki hepatositlerde AgNOR değerlerinin de duişuk oluşu, bu hucrerelerin gosterdiği pre-neoplastik değişikliklerin bir gostergesi olarak yorumlanmıştır.

S O N U Ç L A R

1. Sağlam kontrol grubu ile PH yapılan (II. grup) ve PH yapıp iron dextran verilerek hemosiderozis oluşturulan (III. grup) kontrol deney hayvanlarında, 5 aylık deney süresi sonunda vücut ve karaciğer ağırlığı yönünden bir farklılık görülmemiştir.

2. Kontrol grupları (I., II., III. grup) ile karsinogen olarak 2-AAF verilen IV. ve V. gruplar arasında vücut ve karaciğer ağırlıkları yönünden farklılık olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). Bu açıdan IV. ve V. gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir.

3. Genotoksik bir karsinogen olan 2-AAF ile IV. ve V. grup sıçan karaciğerlerinde odaksal ve nodüler lezyonlar ve oval hücre proliferasyonu gelişmiştir. Kontrol grupları ile IV. ve V. gruplarda odaksal, nodüler lezyon ve oval hücre proliferasyonunun gelişim dereceleri yönünden yapılan karşılaştırmada önemli fark bulunmakla beraber, sadece IV. grubun nodüler lezyonlarının gelişimi yönünden kontrol grupları ile yapılan istatistiksel karşılaştırma anlamlı değildir.

4. Kontrol grupları ile IV. grupta gelişen fokal nekrozun ortaya çıkışında önemli düzeyde farklılık var-

dır. Ancak kontrol grupları ile V. grup bu açıdan karşılaştırıldığında aradaki fark önemli değildir.

5. III ve V nolu gruplara deney bitiminden önceki son 15 gün içerisinde subkutan iron dextran verilerek karaciğerde makroskopik ve mikroskopik olarak hemosiderozis oluşumu gözlenmiştir. Mikroskopik olarak III. grupta demir tutulumunun tüm hepatositlerde aynı oranda olduğu gözlenmişken, V. grup sıçanların karaciğerlerinde, lezyon bölgelerinde demirin çevre sağlam görünümlü parankim hücrelerine nazaran daha az tutulduğu, ya da hiç tutulmadığı saptanmıştır. Bu da bize lezyonlardaki hepatositlerin fenotipik değişiklikler gösterdiğini ve bu özellikten yararlanılarak preneoplastik lezyonların deneysel hemosiderozis ile daha kolay ortaya konabileceği sonucunu vermiştir.

6. Tüm deney gruplarında yapılan AgNOR sayımlarında, nüve başına düşen ortalama AgNOR değerleri, IV. ve V. gruplarda, kontrol gruplarına göre düşük olarak saptanmış olup, sadece IV. deney grubundaki nodüler lezyonların AgNOR değerleri kontrol gruplarındaki düzeydedir.

7. IV. gruptaki nodüler lezyonlarda bazofilik hücre varlığından AgNOR değerleri daha yüksek bulunmuştur.

8. IV. ve V. grup sıçanlarda karsinogen olarak verilen 2-AAF ile oluşan odaksal ve nodüler lezyonlarda hücresel özelliklerin benzer olduğu görülmüş olup, bu bulgu nodüler lezyonların odaksal lezyonlardan geliştiği sonucunu doğurmuştur.

Ö Z E T

Bu çalışmada, parsiyel hepatektomiye takiben genotoksik bir karsinojen olan 2-AAF i 200 p.p.m. dozunda içeren diet ile 5 ay süre ile beslenen Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlarda, deneysel hemosiderozis oluşturularak da belirlenen preneoplastik lezyonların geliştiği saptandı. AgNOR yöntemi uygulanarak bu lezyonların özellikleri araştırıldı.

S U M M A R Y

In this study, preneoplastic lesions which are also identified by experimentally constituted hepatic hemosiderozis, were established in Wistar-Albino male rats which were fed with a diet containing 200 p.p.m. 2-AAF, a genotoxic carcinogen, for 5 months after partial hepatectomy. Features of these lesions were researched using AgNOR method.

K A Y N A K L A R

1. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V.: Neoplasia. Pathologic basis of disease. The W.B. Saunders Co., Igaku-Shoin/Saunders, Press, III, 1984, s. 237-240.
2. Yenerman, M.: Tümör epidemiyolojisi. Genel Patoloji. İstanbul, 1981, s. 1139-1150.
3. Robbins, S.L., Kumar, V.: Neoplasia, Basic Pathology. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Press, IV., 1987, s. 182-212.
4. Yenerman, M.: Tümörlerin etyolojisi. Genel Patoloji. İstanbul, 1981, s. 1082-1083.
5. Diamandopoulos, G.T., Meissner, W.A.: Neoplasia. Kissane, J.M. (Ed.): Anderson's Pathology. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Press VIII, 1985, s. 514-559.
6. Sell, S.: Distribution of α -Fetoprotein-and albumin-containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of N-2 fluorenylacetamide. Cancer Res., 38:3107-3113, 1978.
7. Peraino, C., Staffeldt, F.E., Carnes, B.A., et al.: Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or benzo(a) pyrene within one day after birth. Cancer Res., 44:3340-3347, 1984.

8. Williams, G.M.: The significance of preneoplastic liver lesions in experimental animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 31:21-44, 1987.
9. Williams, G.M.: Functional markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes. *Cancer Res.*, 36:2540-2543, 1976.
10. Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P., et al.: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 49:93-106, 1972.
11. Williams, G.M., Watanabe, K.: Quantitative kinetics of development of N-2-fluorenylacetamide induced, altered (hyperplastic) hepatocellular foci resistant to iron accumulation and of their reversion or persistence following removal of carcinogen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61:113-121, 1978.
12. Hirota, N., Williams, G.M.: The sensitivity and heterogeneity of histochemical markers for altered foci involved in liver carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, 95:317-328, 1979.
13. Williams, G.M., Klaiber, M., Parker, S.E., et al.: Nature of early carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57:157-165, 1976.
14. Bannasch, P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. *Cancer Res.*, 36:2555-2562, 1976.

15. TsaO, M.S., Grisham, J.W.: Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. *Am. J. Pathol.*, 127:168-181, 1987.
16. Reuber, M.D.: Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025 percent N-2 fluorenyldiacetamide, *J. Natl. Cancer Inst.*, 34:697-724, 1965.
17. Mori, H., Sugie, S., Ohbayashi, F., et al.: Reduced DNA repair response of cells from carcinogen-induced rat liver altered foci exposed to chemical carcinogens in culture. *Carcinogenesis*, 6:1087-1090, 1985.
18. Ward, J.M., Ohshima, M.: Evidence for lack of promotion of the growth of the common naturally occurring basophilic focal hepatocellular proliferative lesions in aged F344/NCr rats by phenobarbital. *Carcinogenesis*, 6:1255-1259, 1985.
19. Kayaalp, O.: İlaçların istenmeyen etkileri (İlaç toksisitesi). *Tıbbi Farmakoloji*, Ankara, 2. baskı, 1981, s. 261-315.
20. Yenerman, M.: Tümör etyolojisinde kimyasal nedenler (kimyasal karsinojenler). *Genel Patoloji*. İstanbul, 1981, s. 1084-1090.
21. Yenerman, M.: Karsinogenez (tümör teorileri ve karsinogenezde hücrelerde morfolojik ve biyolojik değişiklikler). *Genel Patoloji*. İstanbul, 1981, s. 1116-1138.
22. Walker, R.A.: The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology*. 12:221-223, 1988.

23. Patoloji Sempozyumu, 2-3 Kasım 1989, Adana, Uhri, M., Barut, G., Evren, İ.: Servikal neoplazilerin tanısında AgNOR yönteminin katkısı. Bildiri.
24. Castaing, D., Houssin, D., Bismuth, H.: Anatomy of the liver and portal system of the rat. Hepatic and portal surgery in the rat. Mason, Paris, 1980, s. 27-45.
25. Castaing, D., Houssin, D., Bismuth, H.: Partial hepatectomies, hepatic and portal surgery in the rat. Mason, Paris, s. 125-129, 1980.
26. Cameron, R.G., Imaida, K., Tsuda, H., et al.: Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine. Cancer Res., 42:2426-2428, 1982.
27. Kurata, Y., Tsuda, H., Tamano, S., et al.: Inhibitory potential of acetaminofen and o⁻,m⁻,p⁻ aminophenols for development of o -glutamyltranspeptidase-positive liver cell foci in rats pretreated with diethylnitrosamine. Cancer Letters, 28:19-25, 1985.
28. Kitahara, A.K., Satoh, K., Nishimura, K., et al.: Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. Cancer Res., 44:2698-2703, 1984.
29. Pereira, M.A., Stoner, G.D.: Comparison of rat liver foci assay and strain a mouse lung tumor assay to detect carcinogens: A review. Fundamental and applied toxicology, 5:688-699, 1985.

30. Stout, D.L., Becker, F.F.: Metabolism of 2-aminofluorene and 2-acetylaminofluorene to mutagens by rat hepatocyte nuclei. *Cancer Res.*, 39:1168-1173, 1979.
31. Teebor, G.W., Becker, F.F.: Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 31:1-3, 1971.
32. Bannasch, P.: Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, 7:689-695, 1986.
33. Newberne, P.M., Punyarit, P., Camargo, J., et al.: The role of necrosis in hepatocellular proliferation and liver tumors, mouse liver tumors. *Arch. Toxicol.*, (Suppl. 10):54-67, 1987.
34. Squire, R.A., Levitt, M.H.: Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, 35:3214-3223, 1975.
35. Becker, F.F.: Alteration of hepatocytes by subcarcinogenic exposure to N-2-fluorenylacetamide. *Cancer Res.*, 35:1734-1736, 1975.
36. Farber, E.: Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 16:142-148, 1956.

37. Williams, G.M., Ohmari, T., Watanabe, K.: The persistence and phenotypic stability of transplanted rat liver neoplastic nodules. *Am. J. Pathol.*, 99:1-12, 1980.
38. Watanabe, K., Williams, G.M.: Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promotor phenobarbital: Evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promotor acts on carcinogen-induced lesions. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61:1311-1314, 1978.
39. Solt, D.B., Medline, A., Farber, E.: Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, 88:595-618, 1977.
40. Farber, E., Parker, S., Gruenstein, M.: The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. *Cancer Res.*, 36:3879-3887, 1976.
41. Menteş, N.K., Menteş, G.: Protein sentezi, metabolizmanın genetik olarak düzenlenişi. *Fizyolojik Kimyaya Bakış (Çeviri)* (Harper, A.H.: Review of physiological chemistry, Los Altos, California, Press XIV), İzmir, 1976, s. 81-93.
42. Hall, P.A., Crocker, J., Watts, A., et al.: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 12:373-381, 1988.

43. Crocker, J., Skilbeck, N.: Nucleolar organizer regions in cutaneous melanotic lesions: A quantitative study. *J. Clin. Pathol.*, 40:885-889, 1987.
44. Crocker, J., Ayres, J., McGovern, J.: Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. *Thorax*, 42:972-975, 1987.
45. Smith, R., Crocker, J.: Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology*, 12:113-125, 1988.
46. Rabes, H.M., Bucher, Th., Hartman, A., et al.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. *Cancer Res.*, 42:3220-3227, 1982.
47. Styles, J.A., Kelly, M., Elcombe, C.R.: A cytological comparison between regeneration, hyperplasia and early neoplasia in the rat liver. *Carcinogenesis*, 8:391-399, 1987.
48. Teebor, G.W., Seidman, I.: Retention of metabolic regulation in the hyperplastic hepatic nodule induced by N-2 fluorenylacetamide. *Cancer Res.*, 30:1095-1101, 1970.
49. Moreno, F.J., Villamarin, A., Herdugo, G.G., et al.: Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) in semithin lovicryl sections. *Stain Technology*, 63:27-31, 1988.
50. Egon, M.J., Crocker, J.: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors, *J. of Pathology*, 154:247-253, 1988.

51. Howat, A.J., Gird, D.D., Cotton, D.W.K., et al.: Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer*, 63:474-478, 1989.
52. Leong, S.Y., Gilham, P.: Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Human Pathology*, 20:257-262, 1989.
53. Egon, M.J., Raafat, F., Crocker, J. et al.: Nucleolar organizer regions in small cell tumors of childhood. *J. of Pathology*, 153:275-280, 1987.
54. Yongshan, Y., Stanley, W.S.: Effect of differentiating agents on nucleolar organizer region activity in human melanoma cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 31:253-262, 1988.

EK-Tablo 1. III., IV. ve V. deney grubu sıçanların
vücut ve karaciğer ağırlıkları.

Denek No.	Vücut ağırlığı/g			Karaciğer ağırlıkları/g		
	III.grup	IV.grup	V.grup	III.grup	IV.grup	V.grup
1	170	95	90	7.935	3.80	3.76
2	180	90	100	6.115	3.50	3.04
3	160	100	90	7.405	3.00	3.09
4	140	110	105	6.11	3.25	3.10
5	165	100	80	7.36	3.15	2.67
6	150	90	95	6.475	3.8	3.78
7		85	115		2.75	4.26
8		85			2.60	
9		100			3.06	
10		90			3.45	
11		90			3.00	
12		95			3.70	
13		115			4.10	
14		95			3.7	
15		80			2.50	
16		85			3.1	
17		90			3.4	
18		100			3.2	
19		95			3.7	
20		105			3.15	
21		85			2.80	

Ek-Tablo 2. Deney gruplarındaki histopatolojik bulgular.

	I. Grup				II. Grup				III. Grup				IV. Grup				V. Grup			
Denek No.	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz	Odaksal lezyon	Nodüler lezyon	OHP	Fokal nekroz
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4.3	0.3	2	0
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	43.6	0.6	0	0	3.0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.6	4.0	1	1	0.6	1.3	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.6	5.0	3	3	1.6	0.6	2	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10.6	0	1	1	17	1.6	3	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.6	2.6	3	0
7													12.6	0.3	0	1	14.3	1.6	2	0
8													8.6	0	3	2				
9													3	0	0	2				
10													0	0	0	1				
11													24.6	0.8	3	3				
12													0	0	2	2				
13													1.6	0	0	1				
14													5.6	0	2	0				
15													8.6	0	0	2				
16													6.3	0	1	1				
17													12.6	0	1	1				
18													4.3	0	2	1				
19													18.0	8	0	1				
20													13.03	0	0	2				
21													0	0	0	0				

Not: Değerler 10 lük büyütme ile 10 sahada sayılarak verilmiştir. OHP: Oval hücre proliferasyonu.