

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

HEPATOSELÜLER KARSİNOMDA SPİNK1(TATI)'İN
TANI DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN

Dr. Buket AKYÜZ ERDOĞAN

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİMDALI

DANIŞMANI

Prof. Dr. Neşe KARADAĞ

Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER DİZİN.....	ii
RESİMLER DİZİNİ.....	iii
TABLO.....	iv
KISALTMALAR.....	v
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karaciğer Anatomisi.....	2
2.2. Karaciğer Histolojisi.....	3
2.3. Hepatoselüler Karsinom.....	4
2.4. Öncü ve Erken Lezyonlar.....	6
2.5. Kolanjiyokarsinom.....	7
2.6. Spink1.....	8
3. MATERYAL ve METOD.....	9
4. BULGULAR.....	11
5.TARTIŞMA.....	18
6. SONUÇLAR.....	22
7. ÖZET.....	23
8. SUMMARY.....	24
9. KAYNAKLAR.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Karaciğer segmentleri.....	2
Şekil 2: Normal karaciğer dokusunda santral ven ve portal alan birlikteliği....	3
Şekil 3: Karaciğer zonları.....	3
Şekil 4: Hepatokarsinogenez.....	6



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Hepatoselüler Karsinom.....	14
Resim 2a: Hepatoselüler Karsinomun Spink1 ekspresyonu.....	14
Resim 2b: Hepatoselüler Karsinomun Spink1 ekspresyonu.....	15
Resim 3: İntrahepatik Kolanjiyokarsinom.....	15
Resim 4: Kolanjiyokarsinomun Spink1 ekspresyonu.....	16
Resim 5: Yüksek Dereceli Displastik Odak.....	16
Resim 6: Yüksek Dereceli Displastik Odak' ın Spink1 ile yamalı ekspresyonu..	17
Resim 7: Normal karaciğer dokusunda safra duktuslarının Spink1 ekspresyonu..	17
Resim 8: Normal karaciğerde yaygın Spink1 ekspresyonu.....	18

TABLÖLÄR

Tablo 1: HSK, KK, DDDO, YDDO ve kontrol grubu vakalarının yaş ve cinsiyet Dağılımı.....	12
Tablo 2: HSK, KK ve kontrol grubu vakalarının boyanma yaygınlığı.....	12
Tablo 3: HSK, KK, DDDO, YDDO ve Kontrol grubunun Spink1 ile boyanması.....	13



KISALTMALAR

AFP	: Alfafetoprotein
BHD	: Büyük hücre değişikliği
DDDO	: Düşük Dereceli Displastik Odak
DDDN	: Düşük Dereceli Displastik Nodül
DN	: Displastik nodüller
EMA	: Epitelyal membran antijen
FOXP1	: Forkhead box protein 1
GPC3	: Glipikan 3
GS	: Glutamin Sentetaz
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HE	: Hematoksilen Eozin
HSK	: Hepatoselüler Karsinom
HSP70	: Heat shock protein 70
İHK	: İmmünohistokimya
KK	: Kolanjiyokarsinom
KHD	: Küçük hücre değişikliği
YDDO	: Yüksek Dereceli Displastik Odak
YDDN	: Yüksek Dereceli Displastik Nodül

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatoselüler Karsinom (HSK) en sık görülen primer karaciğer karsinomudur ve kanserden ölüm sebeplerinde 3. sıradadır (1). HSK'lu hastalarda prognoz kötüdür. Hastaların sadece %20'si küratif cerrahi için uygundur. HSK en sık olarak karaciğer sirozu zemininde ortaya çıkar ve kronik karaciğer hastalarında en sık ölüm sebebidir (2).

Yaş, cinsiyet, kimyasallar, virüsler(HBV, HCV) ve alkol kullanımı gibi birçok faktör HSK gelişimi ile ilişkilidir (3).

Kolanjiyokarsinom (KK), karaciğerin 2.sıklıkta görülen primer karsinomudur. Genel olarak sirozla belirgin ilişki tanımlanamamıştır. Ancak primer sklerozan kolanjitli hastalar KK gelişiminde artmış riske sahiptir (4,5).

Displastik nodüller (DN) sirotik karaciğerlerde sık olarak görülen, nadiren nonsirotik zeminde saptanabilen nodüler lezyonlardır. Displazi derecesine göre düşük dereceli veya yüksek dereceli olarak ikiye ayrılırlar. Yüksek dereceli displastik nodüller HSK' a benzer moleküler değişiklikler göstermekte olup malign transformasyon için yüksek risk taşımaktadır (6).

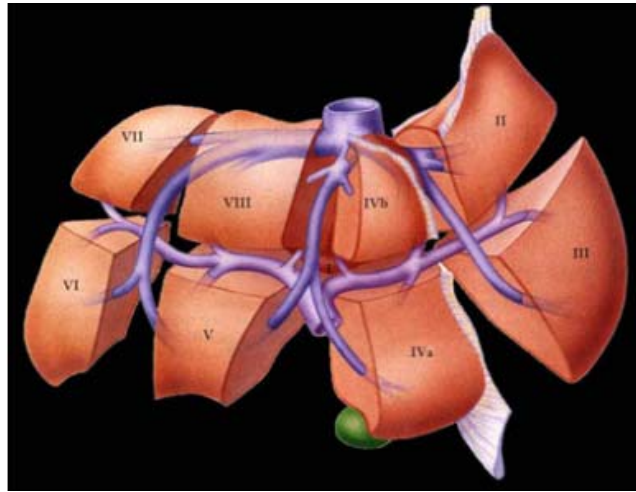
Spink1 (Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1), HSK' da ekspresyonu artan, potansiyel diagnostik belirteç olarak saptanmış bir gendir (1,2,7). Spink1'in DN' ler ve KK' daki rolüne ilişkin az sayıda yayın mevcuttur (1,2,8).

Bu çalışmada arşiv taraması yapılarak 2010-2015 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış HSK, KK ve DN olgularında immünohistokimyasal olarak Spink1 belirteci çalışılarak sonuçlar literatür ile karşılaştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi

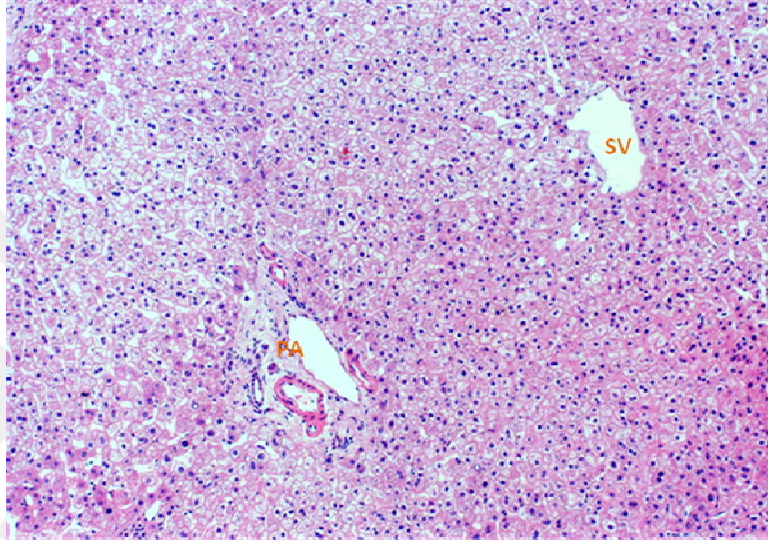
Karaciğer ağırlığı, kadınlarda 1400 g, erkeklerde 1800 g civarında olup erişkinde tüm vücut ağırlığının %2 sini oluşturur (9). Dış yüzde falsiform ligament ile sağ ve sol loblara ayrılır. Fonksiyonel bir sınıflama olan Couinaud sınıflamasına göre ise karaciğer 8 bağımsız fonksiyonel segmentten oluşur. Her segmentin kendi portal pedikülü mevcuttur. Segmentler saat yönüne göre numaralandırılır Sol lob segment II, III ve IV; sağ lob segment V-VIII' den oluşur(Şekil 1) . Kaudat lob; segment I olarak numaralandırılır; kanlanması hem sağ hem de sol taraflı vaskülatürden olup hepatik ven direkt vena cava inferiora boşalır. Karaciğerin kanlanması dual sisteme sahip olup %20 hepatik arter ve %80 portal ven yoluylaadır. Portal ven superior mezenterik ven ve splenik venin birleşmesi ile oluşur.



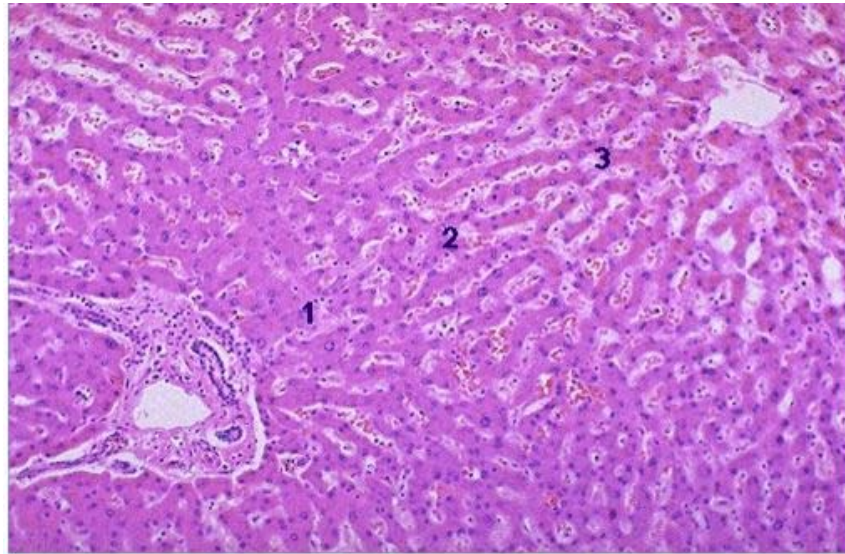
Şekil 1: Karaciğer segmentleri, *Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dr. Muzaffer Başak*' in ' *Karaciğer lezyonlarının benign malign ayrımında PET benzeri kontrasta sahip MR difüzyon görüntülerinin değeri* ' isimli radyoloji uzmanlık tezi' nden alınmıştır.

2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğerin fonksiyonel ünitesi hepatik lobül veya hepatik asinüs (Rappaport) olarak adlandırılır. Lobül polihedral bir yapı olup santral venül ve buradan ışınal olarak portal alanlara uzanan hepatosit kordonlarından oluşur (Şekil 2). Rappaport'un asinüsü ise portal venül ve hepatik arterin terminal dallarından terminal hepatik venüle boşalan kan akımı yönünü takip eder. Azalan doku oksijenizasyonuna göre periportal alan zon 1, perisantral alan zon 3 aradaki bölüm ise zon 2 olmak üzere asinüs 3 zona ayrılır (10) (Şekil 3).



Şekil 2: Normal karaciğer dokusunda santral ven(SV) ve portal alan(PA) birlikteliği



Şekil 3: Karaciğer zonları 1(zon1): periportal alan 2(zon2):orta bölge 3(zon3):perisantral bölge

Hepatositler yetişkinlerde normalde bir hücre kalınlığında sinüzoidlerle ayrılmış kordonlar şeklinde , 5-6 yaşına kadar olan çocuklarda ise iki hücreden oluşmuş tabakalar şeklinde düzenlenmiştir. Hepatosit 25 mikrometre çapında poligonal epitelial hücredir (10). Bir veya daha fazla nükleol içeren yuvarlak, santral yerleşimli nükleusu vardır. Nükleus binükleer olabileceği gibi değişik büyüklükte de olabilir. Mitoz nadirdir. Hepatosit sitoplazması ince bazofilik granüllere sahip olup geniş ve eozinofiliktir. Sitoplazmik glikojen mevcuttur. Zon 3' te açık kahverenkli, sitoplazmik granüller şeklinde lipofuksin bulunur. Demir ve bakır kaba granüler olup ışığı çift kırma özelliğine sahiptir, daha çok zon 1 hepatositlerde yer alır.

Normal karaciğerde *sinüzoidler* birkaç kan hücresi içeren yarık tarzında boşluklardır. Sinüzoidlerde normalde elastik membran ve bazal tabaka yoktur. Hepatik sinüzoidler hepatik kordonlardan retikülün lifleri ile destekli sinüzoidal kordonları döşeyen Kupffer ve endotel hücreler tarafından ayrılır. Kupffer hücreleri karaciğerin yerleşik makrofajlarıdır.

Her bir *portal alan* bir safra kanalı, birkaç safra duktülü, bir hepatik arter dalı, bir portal ven dalı ve lenfatik kanalların içine gömüldüğü bağ dokusundan oluşmaktadır. Portal alanı sınırlayan hepatositler sınırlayıcı tabaka olarak isimlendirilirler.

İntrahepatik veya septal *safra kanalları* bazalde yerleşmiş oval nükleuslu, eozinofilik sitoplazmalı kolumnar epitelial hücrelerle döşelidir. Safra kanalları hemen her zaman bir portal ven ve bir hepatik artere eşlik eder. Safra kanalları safra kanaliküllerine safra duktülleri ve Hering kanalları ile bağlanır.

2.3. Hepatoselüler Karsinom

Hepatoselüler Karsinom (HSK), karaciğerin erişkinlerde en sık görülen primer epitelial tümörü olup dünya çapında 6. en sık kanserdir (1). Coğrafik dağılım erkekler ve kadınlar için benzerdir, fakat erkeklerde risk önemli derecede artmıştır. Asya'da 25-49 yaş arası erkeklerde karaciğer kanseri 2. en sık tümördür (11). Amerika ve İngiltere' de ise kanser ölümleri sebeplerinden en hızlı artış gösteren kanserdir (2).

Etyoloji: Karaciğer sirozu HSK için, etyolojiden bağımsız olarak, majör klinik risk faktörüdür. HSK etyolojisinde kronik viral hepatit (HBV ve HCV) vakaların yaklaşık %85'ini oluşturan en önemli nedendir (12). Alkol, sigara, aflatoksin B1, demir birikimi, özellikle herediter hemokromatoz, diğer eksojen risk faktörleridir. Genetik hastalıklardan Alfa-1- antitripsin eksikliği HSK gelişimi riskini önemli ölçüde

arttırmaktadır. Obezite ve nonalkolik steatohepatitin de HSK riskini arttırdığı bilinmektedir (11).

Klinik Bulgular: Klinik bulgular arasında karın ağrısı, halsizlik, kilo kaybı vardır. Özellikle ileri dönemde serum AFP yüksekliği HSK lehine bir bulgudur (13).

Görüntüleme: HSK ile ilişkili tipik bulgular dinamik bilgisayarlı tomografide, dinamik manyetik rezonans veya kontrast arttırıcı USG’de artmış arteriyel hipervaskülarite ile birlikte venöz solukluktur. Erken HSK tanısında problemlili konu, bulguların sıklıkla displastik nodüller ile benzer olmasıdır. Erken HSK’nın displastik nodüllerden ayırımında Gadolinium-ethoxybenzyl DTPA manyetik rezonans en sensitif görüntüleme aracıdır (14).

Makroskopi: Makroskopik olarak HSK sınırlı tek bir kitle, multipl nodül, sirozu taklit eden diffüz karaciğer tutulumu şeklinde ya da karaciğerin çoğunu kaplayan büyük bir kitle olarak görülebilir. Sıklıkla fibröz psödokapsül içerir fakat nonsirotik karaciğer zemininde kapsül içermeyebilir. Tipik olarak çevre karaciğerden yumuşaktır. Karaciğerde HSK görünümleri sırasıyla soliter, multinodüler, diffüz ve masif formlar olarak adlandırılırlar (11, 13).

Mikroskopi: Mikroskopik olarak HSK; trabeküler, solid ya da asiner büyüme paternleri gösterebilir (13). Sitolojik varyantları pleomorfik, berrak, iğsi hücreler ve yağlı değişiklik, safra üretimi, hyalin cisimler, soluk cisimler olarak izlenir. HSK’un özel tipleri de mevcuttur. Bunlar fibrolameller karsinom, skiröz karsinom, andiferansiye karsinom, lenfoepitelyoma benzeri karsinom ve sarkomatoid tip karsinomdur (11). HSK’un asiner formu papiller yapı benzeri oluşumlar yaparak KK ile tanısal karışıklığa yol açabilir (13).

HSK için önemli bir tanısal özellik trabekül kalınlığıdır; trabekül ne kadar kalın ise karsinom olasılığı o kadar yüksektir (15). Trabekül kalınlığı; rutin HE kesitlerde tahmin edilebilir ancak retikülin boyası ile daha iyi değerlendirilir. Portal ven invazyonu da sık görülen diğer bir bulgudur (13).

İmmünohistokimyasal olarak HSK; AFP, EMA, fibrinojen, IgG, albümin, villin, C reaktif protein, HepPar-1 ve Glipikan-3 ve Arjinaz-1 ile pozitifdir (13). En sık kullanılan belirleyicilerden Glipican-3 HSK tanısında %77 sensitivite, %96 spesifite gösterir (11).

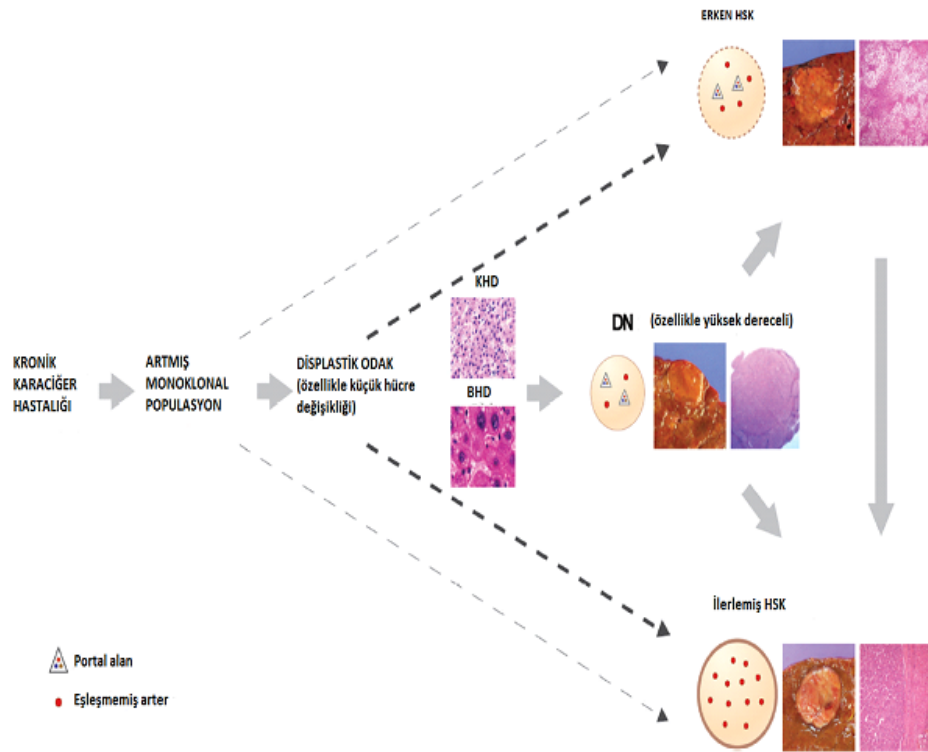
2.4. Öncü ve Erken Lezyonlar

Kronik karaciğer hastalığında karsinogenez ile ilişkili hepatoselüler değişiklikler; küçük hücre değişikliği, büyük hücre değişikliği, displastik odak ve nodülleri içerir (13).

Küçük hücre değişikliği hepatositlerin hücre volümünün azalması ile nükleer kalabalıklaşma izlenimi, artmış N/S oranı, hafif nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi, sitoplazmik bazofili ile tanımlanır. Küçük hücre değişikliği çevredeki hepatositlerden yüksek proliferasyon indeksi, kromozomal kayıp veya kazanımlar, telomer kısalması, morfolojik olarak erken HSK'ya benzemesi, histolojik olarak HSK'nın devamı olması ile ayrılır (6, 14, 16).

Büyük hücre değişikliği hepatositlerde hem nükleer hem de sitoplazmik büyüme (N/S oranı korunmuş), nükleer pleomorfizm, nükleer hiperkromazi ve multinükleasyonla tanımlanır.

Bu değişikliklerin natürü ile ilişkili veriler tartışmalıdır; bu nedenle büyük hücre değişikliğinin heterojen bir antite olabileceğini düşünülmektedir (6, 16).



Şekil 4: Hepatokarsinogenez

Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135: 704-715' den alınmıştır.

Displastik Odaklar (DO) histolojik olarak çoğu küçük hücre değişikliği gösteren hepatosit gruplarından oluşan çapı 1mm'den küçük mikroskopik lezyonlardır. Displastik odaklar sıklıkla sirotik karaciğerlerde saptanır ve genellikle çok sayıdadır (14, 16).

Displastik Nodüller (DN), genellikle sirotik karaciğerde bulunur fakat bazen siroz gelişmeden de kronik karaciğer hastalığında görülebilir (6,14). Tek veya birden fazla olabilirler. Makroskopik incelemede sınırları belirsiz veya belirgindir. Boyutları birkaç mm'den birkaç cm'ye kadar değişir ancak çoğu 15 mm'den küçük çaptadır.

HSK, karaciğerin kesit yüzünde boyut, renk, yapı veya yüzeyden kabarıklık/taşma ile çevredeki sirotik nodüllerden ayrılırlar (1).

DN' ler düşük dereceli DN ve yüksek dereceli DN olarak 2'ye ayrılır. *Düşük dereceli displastik nodüller (DDD)* minimal atipi gösteren hepatositlerden oluşur; N/S oranı korunmuş ya da hafif artmıştır. Mitoz yoktur.

Yüksek dereceli displastik nodüller (YDD), fokal ya da diffüz küçük hücre değişikliği ve yapısal atipi ile karakterizedir: 3 hücre kalınlığına kadar trabeküller, seyrek psödogland ve ekspansil subnodül.

Hücrel proliferasyonu işaret eden özellikler (sitoplazmik bazofili, yüksek N/S oranı, nükleer hiperkromazi veya düzensiz nükleer kontur), steatoz ve Mallory-Denk cisimcikleri görülebilir. Bu özellikler YDD ve DDD ayırımında yardımcı özelliklerdir. YDD tanısını koymak için lezyonda görülen atipi HSK tanısı için yetersiz olmalıdır (1,13).

DN' ler kan akımını hem portal alandan hem de yeni oluşmuş arterlerden sağlar (15). Portal alanlar genellikle görülür fakat az ve dağınık halde olabilir. Bu yeni oluşmuş arterler hem sayı hem de boyut olarak DDD'de daha az belirgindir; YDD'de görülme sıklıkları artar (6).

2.5. Kolanjiyokarsinom

KK, HSK'ya göre daha seyrek görülür ve karaciğerin primer malign tümörleri arasında 2. sıradadır (16). KK olgularının çoğu 60 yaşından sonra ortaya çıkar (17). Mikroskopik olarak tümör bir adenokarsinom olup kübik veya kolumnar hücreler ile döşeli duktus benzeri yapılardan oluşur. Kribriiform patern yapabilir. Genellikle stromadan zengindir; bazen neoplastik glandların etrafını çepeçevre sarar bir düzenlenim gösterir. Müsin boyaları hemen her zaman pozitiftir. İmmünohistokimyasal

olarak intrahepatik ve ekstrahepatik KK' lar farklılık gösterir: ilki genellikle CK7+ / CK20+, diğeri sıklıkla CK7 + / CK20- tir (8,13).

HSK'nın asiner formu KK ile karışabileceğinden bu 2 karsinomun ayırıcı tanısı önemlidir. İmmünohistokimyasal boyamada HepPar-1 pozitifliği HSK, MOC-31 pozitifliği ise KK lehinedir (18).

2.6. Spink 1

Spink 1 (Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1), HSK da ekspresyonu artan, potansiyel diagnostik belirteç olarak saptanmış bir gendir (1,2,7). Literatürde TATI(tumour associated trypsin inhibitor) ve PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor) olarak da bilinmektedir (19).

Spink 1 tripsinojen ile birlikte, pankreatik asiner hücreler tarafından pankreatik sıvıya salgılanır. Temel fizyolojik fonksiyonu pankreası, aktive olan tripsinin yıkıcı etkisinden korumaktır. Pankreatitli hastalarda *Spink 1*'in değeri serum ve idrarda artmaktadır. *Spink 1* özellikle gastrointestinal ve genitoüriner traktüsler olmak üzere pek çok ekstrapankreatik dokuda da eksprese edilmektedir: Karaciğer, duodenum, ince barsak, safra kesesi, kolon, apendiks, mide, böbrek, akciğer, meme, beyin, dalak ve over (20).

Spink 1 serumda çeşitli kanserlerde artmaktadır: prostat kanseri, over kanseri, renal hücreli karsinom, mesane kanseri ve kolorektal kanser (20-21). Serum *Spink 1* değerleri kolorektal ve meme kanserli hastalarda karaciğer metastazının araştırılmasında da kullanılmaktadır (21). 7

Spink1 ekspresyonunun HSK'yı benign karaciğer hastalıklarından ve normal karaciğerden ayırmada yardımcı olduğu gösterilmiştir (2). *Spink 1*'in yüksek konsantrasyonları HSK için kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Çeşitli yayınlarda plazma *Spink1* konsantrasyonları HSK hastalarında tümör çapıyla korele olarak artmış, *Spink 1* overekspresyonu HSK'da evreden bağımsız prognostik faktör ve erken tümör rekürrensinde belirleyici olarak bildirilmiştir (7,21). Ayrıca KK' da da artmış *Spink 1* ekspresyonunun erken rekürrens ile ilişkili olduğu bulunmuştur (8).

3.MATERYAL VE METOD

Retrospektif olarak arşiv taraması yapılarak 2010-2015 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış 69 adet HSK ve 15 adet KK, 31 adet düşük dereceli displastik odak (DDDO) ve 6 adet yüksek dereceli displastik odak (YDDO) çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak donör karaciğer dokuları (21 adet) kullanılmıştır.

Displastik lezyonlarda, retrospektif çalışma nedeniyle tanı standardizasyonunu sağlamak açısından, nodül yerine odaklar taranmış, çalışmada patoloji raporlarından yaş, cinsiyet, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı bilgileri toplanmıştır. Demografik bulguların yanı sıra, olgular tekrar değerlendirilerek uygun/ temsil edici bloklar seçilmiş; bu bloklarda immünohistokimyasal olarak Spink1 belirleyicisi çalışılmıştır.

HSK, KK ve kontrol grubunda Spink1 ile boyanma değerlendirmesi yaparken vakalar, sitoplazmik boyanma yüzdelerine göre \leq %5 negatif, %6- 25 hafif boyanma, %26- 50 orta ve %51- 100 şiddetli olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bu ayrımın sebebi daha doğru bir sonuç elde edip, standardizasyon sağlamaktır. Fakat odaklarda yüzde verilemediğinden YDDO ve DDDO bu değerlendirmeye alınamamıştır.

İstatistiksel değerlendirme Pearson Kikare testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Parafin bloklardan pozitif yüklü lamlara alınan kesitler otomatik immünohistokimya boyama cihazında (Ventana BenchMark ULTRA), TATI(E-2): sc-374409 antikoru (1:100 dilusyon; Santa Cruz Biotechnology, Europe) DAB kromojen ve görüntüleme kiti ile boyandı. Boyamalar 1 patolog ve 1 patoloji araştırma görevlisi

tarafından sitoplazmik boyanma açısından değerlendirildi. HSK ve KK olgularında boyanmanın yüzde olarak yaygınlığı, displastik odaklarda ise alanın boyutu nedeniyle boyanma varlığı / yokluğu not edildi.



4. BULGULAR

Çalışma olguları 69 (%57) HSK, 15 (%12) KK, 31 (%26) DDDO ve 6 (%5) YDDO den oluşmaktadır. Kontrol grubu olarak 21 donör karaciğer dokusu kullanılmıştır.

Çalışma vakaları KK olguları dışında, rezeksiyon ya da kama biopsi materyallerini içermektedir. 15 KK olgusunun 7'si iğne biopsisinden oluşmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen 69 HSK olgusunun yaşları 14-84 arasında değişmekteydi (ortalama yaş 57.73). Olguların 59'u erkek (%85.5), 10'u (%14.5) kadındı. E/K oranı 5.9 du (Tablo 1).

KK olgularının yaşları 58-83 arasında değişmekteydi (ortalama yaş 68.26). Olguların 9'u erkek (%60), 6'sı kadındı (%40). E/K oranı 1.5 olarak bulundu (Tablo 1).

DDDO olgularının yaş aralığı 28-68 (ortalama yaş 50.87) olup; olguların 28'i erkek (%90.3) , 3'ü kadındı (%9.7). E/K oranı 9.3 olarak hesaplandı (Tablo 1).

YDDO olgularında yaşı 28-70 arasında değişmekteydi (ortalama yaş 57.33) . Olguların 5'i erkek (%83.3), 1'i kadındı(%16.7). E/K oranı 5 idi (Tablo 1).

Kontrol grubu vakaları yaşları 23-68 arasında değişmekteydi (ortalama yaş 33.45) . Olguların 17'si erkek (%81) , 4'ü kadındı(%19). E/K oranı 4.2 idi (Tablo 1).

HSK olgularının 15'i (%22) negatif, 17'si (%25) hafif boyanma, gene 17'si (%25) orta şiddetli boyanma ve 20'si (%28) şiddetli sitoplazmik boyanma göstermiştir (Tablo 2).

KK olgularının 2'si (%13) negatif, 7'si (%47) hafif boyanma, 3'ü (%20) orta şiddetli, gene 3'ü (%20) şiddetli sitoplazmik boyanma göstermiştir (Tablo 2).

Kontrol grubunun 19'u (%90) negatif, 1'i (%5) hafif boyanma, gene 1'i (%5) orta şiddetli boyanma izlenmiştir. Şiddetli boyanan vaka izlenmemiştir (Tablo 2).

Genel olarak olgu grupları arasındaki median değerler HSK için %30.0 (0-100), KK için %20 (5-90) ve kontrol grubu için % 0.0 (0-40) dır.

31 DDDO olgusunun 10'unda (%32.3), 6 YDDO olgusunun 5'inde (%83.3) Spink 1(TATI) ile boyanma izlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 1: HSK, KK, DDDO, YDDO ve kontrol grubu vakalarının yaş ve cinsiyet dağılımı

	Yaş		Erkek	Kadın	Erkek/Kadın
	Aralık	Ortalama			
HSK	14-84	57.73	59	10	5.9
KK	58-83	68.26	9	6	1.5
DDDO	28-66	50.87	28	3	9.33
YDDO	28-70	57.33	5	1	5
Kontrol	23-68	33.45	17	4	4.25

Tablo 2: HSK, KK ve kontrol grubu vakalarının boyanma yaygınlığı

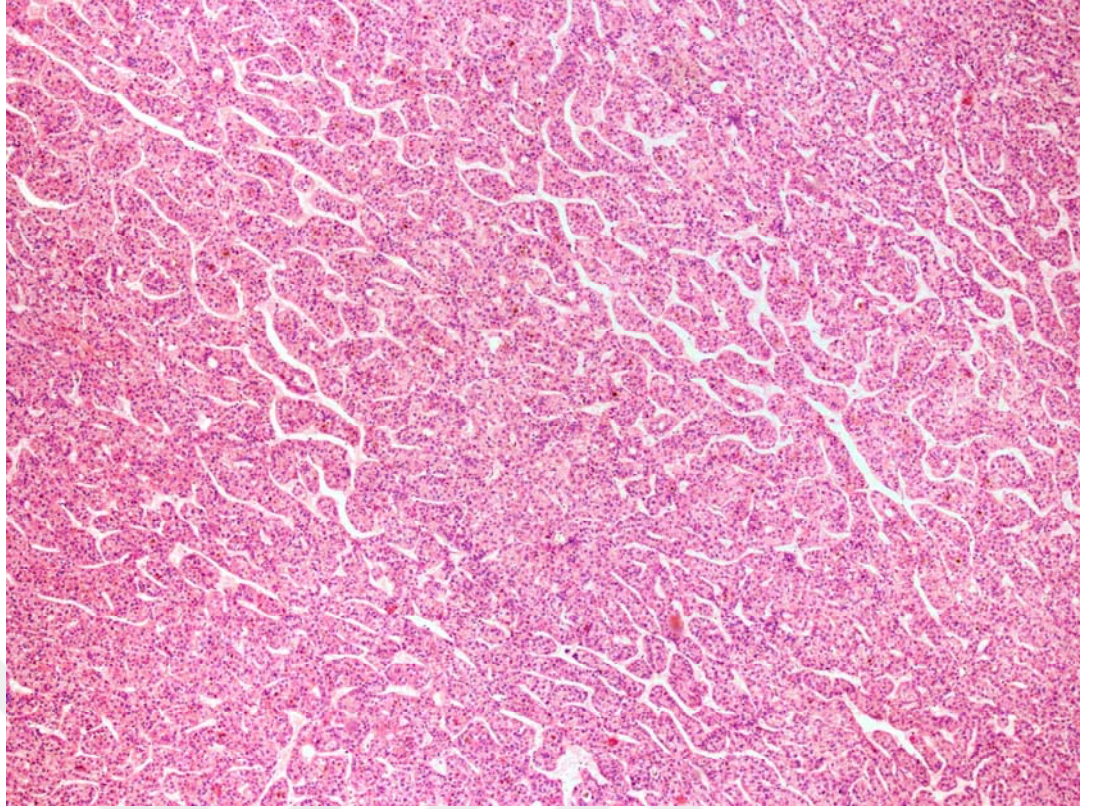
Gruplar	Negatif	Hafif	Orta	Şiddetli	Toplam
HSK(%)	15 (22)	17 (25)	17 (25)	20 (28)	69
KK(%)	2 (13)	7 (47)	3 (20)	3 (20)	15
Kontrol(%)	19 (90)	1 (5)	1 (5)	0 (0)	21
Toplam	36	25	21	23	105

Tablo 3: HSK, KK, DDDO, YDDO ve Kontrol grubunun Spink1 ile boyanması

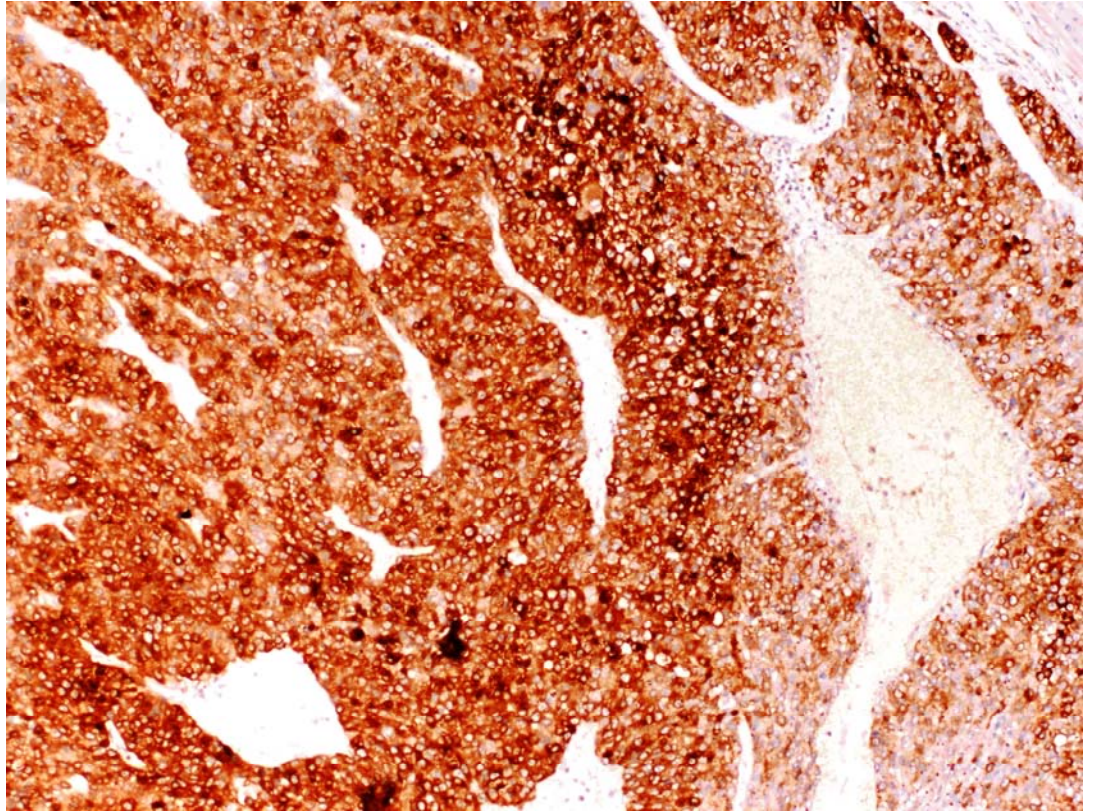
Gruplar	Boyanma		Toplam
	Var	Yok	
HSK (%)	54(%78)	15(%22)	69
KK (%)	13(%87)	2(%13)	15
DDDO (%)	10(%32)	21%68	31
YDDO (%)	5(%83)	1(%17)	6
Kontrol (%)	2(%10)	19(%90)	21

HSK ile DDDO arasında istatistiksel anlamlı fark mevcut ($p= 0.0001$), HSK ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark mevcut ($p= 0.0001$), KK ile DDDO arasında istatistiksel anlamlı fark var ($p= 0.0001$), KK ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark var ($p= 0.0001$), DDDO ile YDDO arasında istatistiksel anlamlı fark var ($p=0.031$). YDDO ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark izlendi ($p=0.0001$).

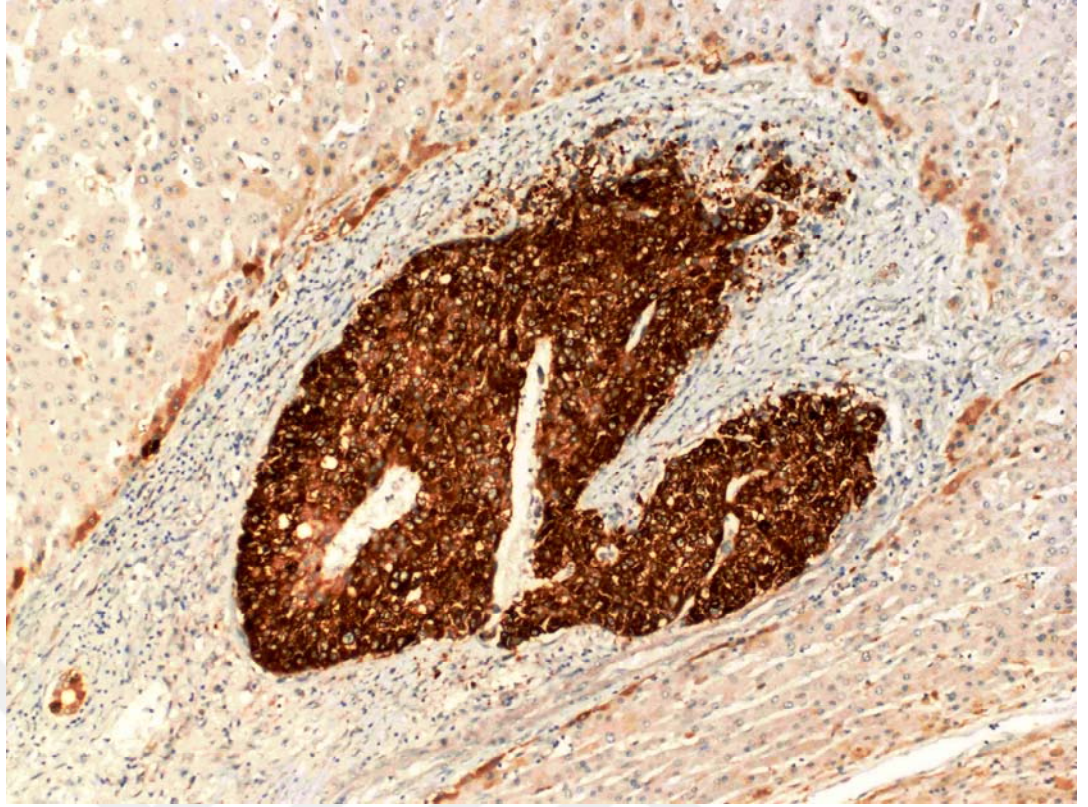
HSK ile KK arasında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p= 0.394$) . HSK ile YDDO arasında istatistiksel anlamlı fark yok ($p=1$), DDDO ve normal karaciğer arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmedi ($p=0.093$).



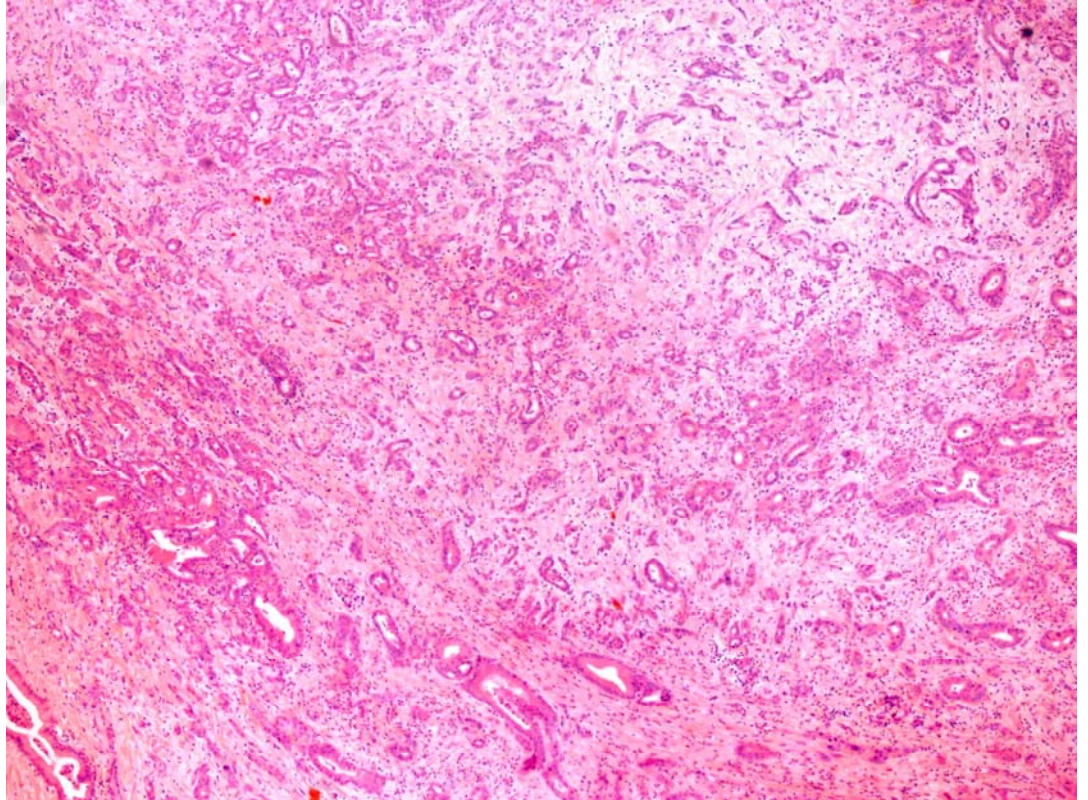
Resim 1: Hepatosellüler Karsinom (HE, x100)



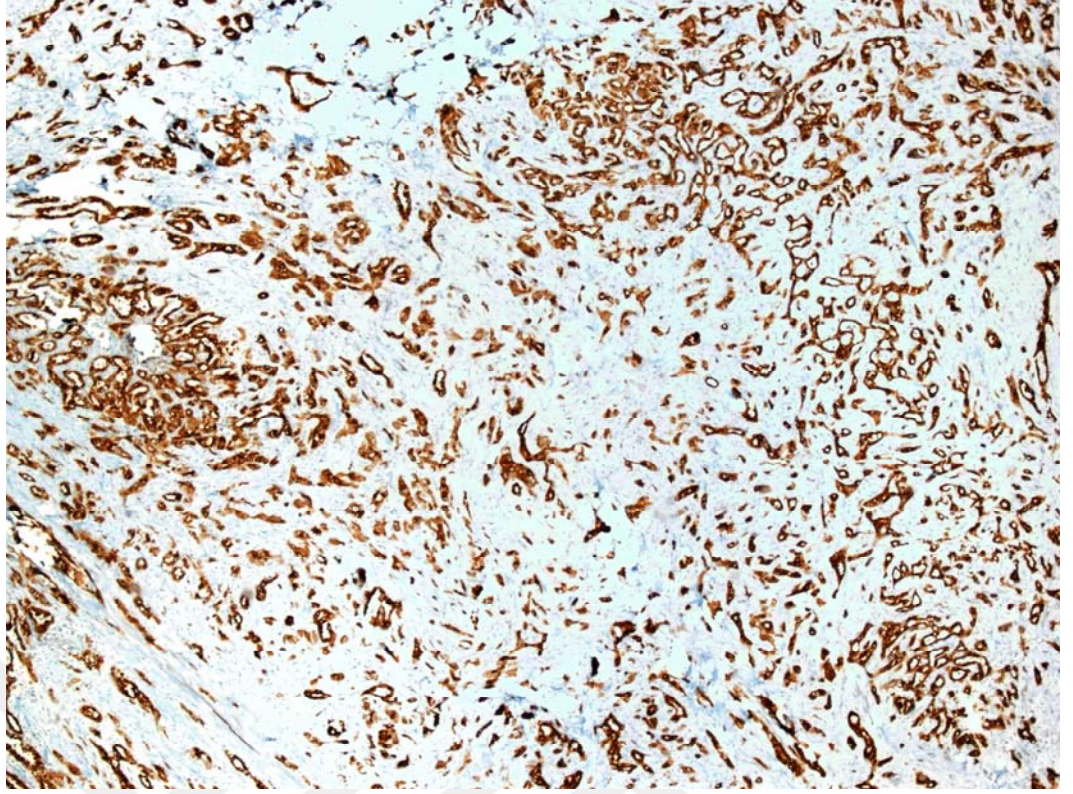
Resim 2a: Hepatosellüler Karsinomun Spink1 ekspresyonu (İHK, x200)



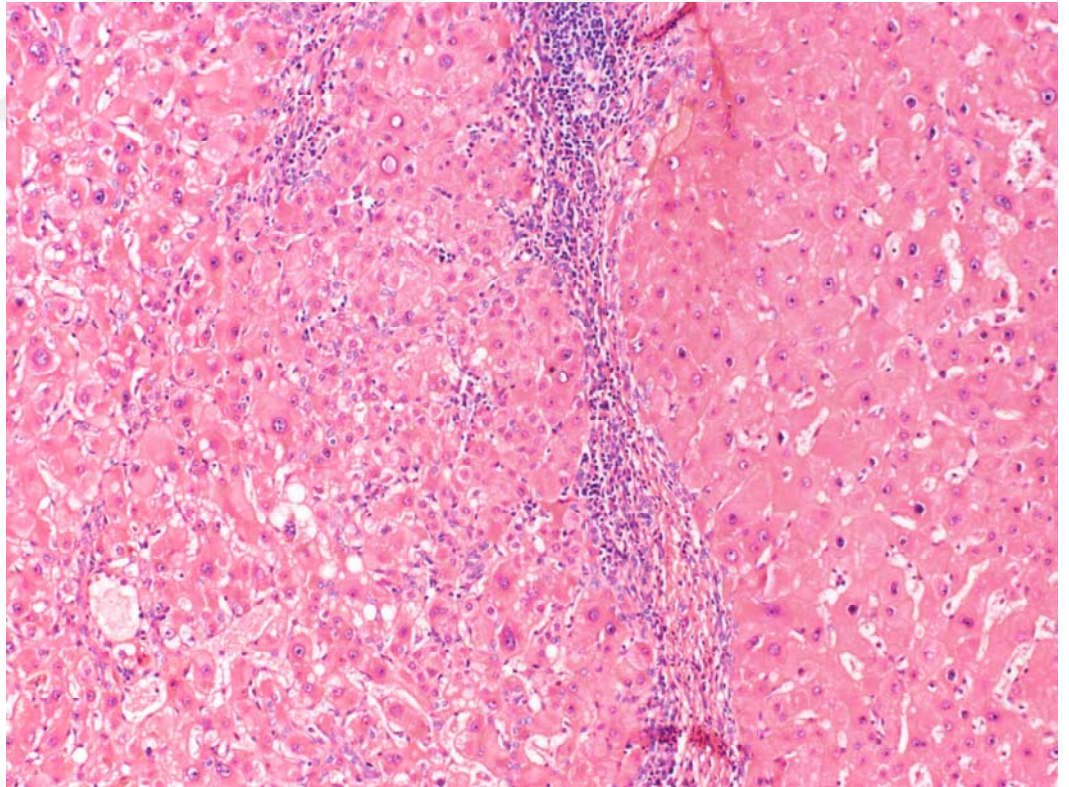
Resim 2b: Hepatosellüler Karsinomun Spink1 ekspresyonu (İHK, x100)



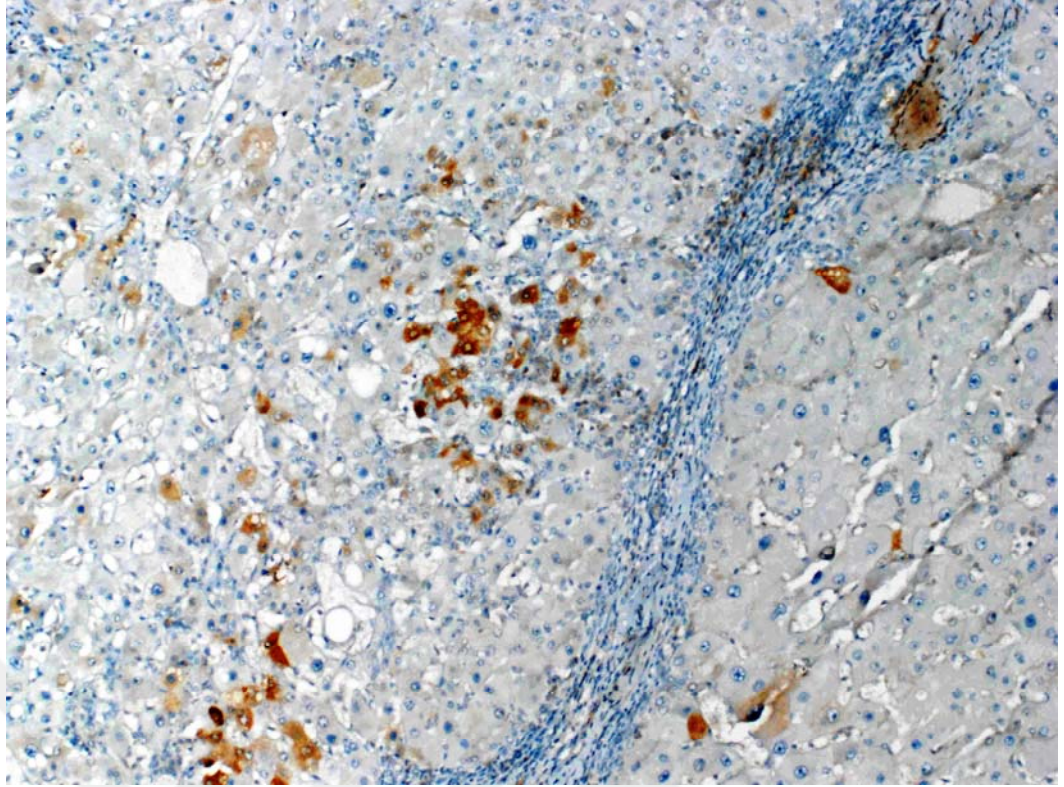
Resim 3: İntrahepatik Kolanjiyokarsinom. (HE, x100)



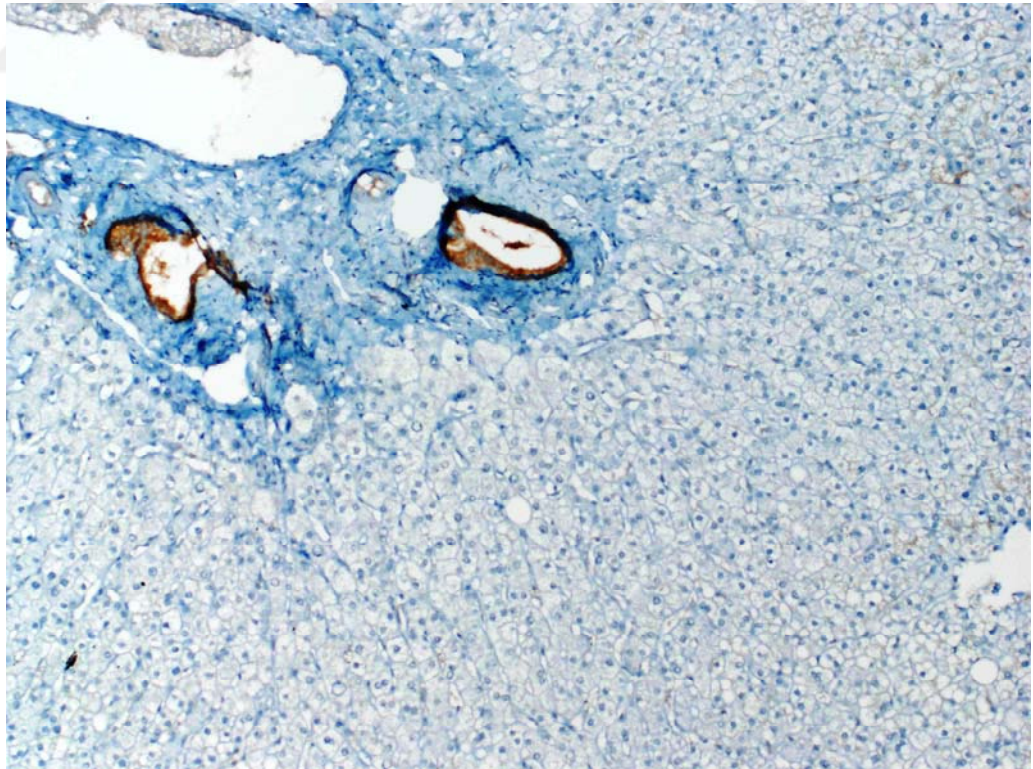
Resim 4: Kolanjiyokarsinomun Spink1 ekspresyonu (İHK, x100)



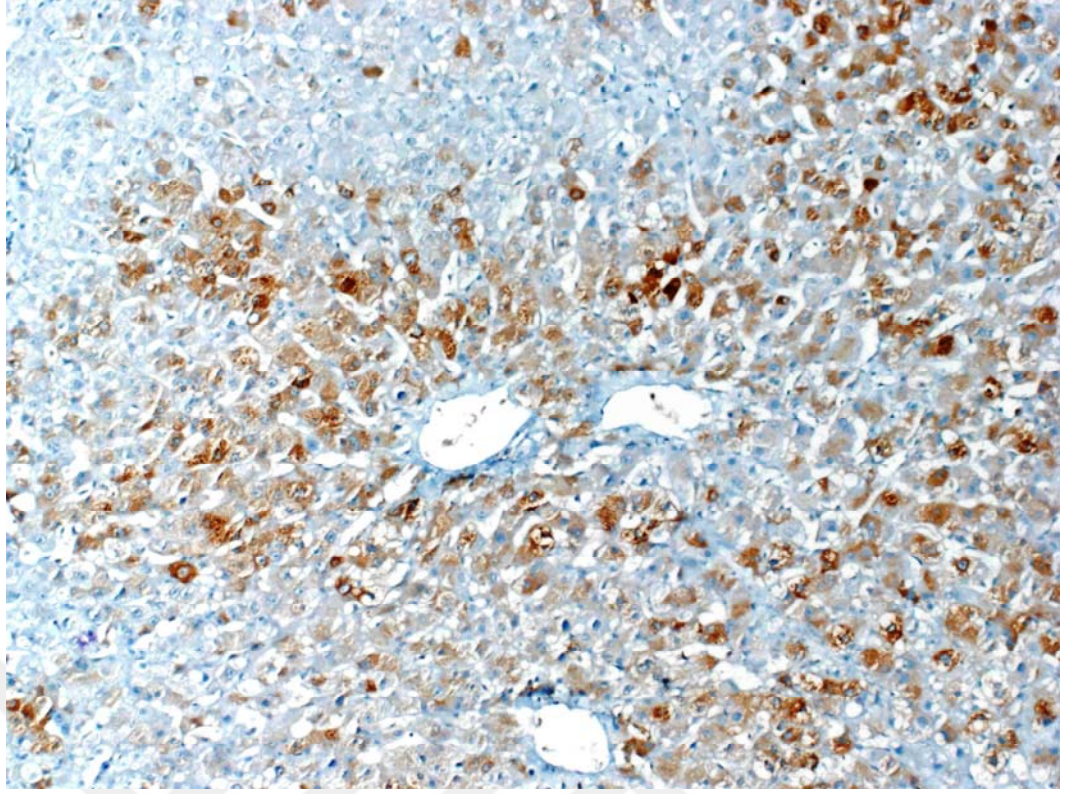
Resim 5: Yüksek Dereceli Displastik Odak. (HE, x100)



Resim 6: Yüksek Dereceli Displastik Odak' ın Spink1 ile yamalı ekspresyonu (İHK, x100)



Resim 7: Normal karaciğer dokusunda safra duktuslarının Spink1 ekspresyonu (İHK, x100)



Resim 8: Normal karaciğerde yaygın Spink1 ekspresyonu (İHK, x100)

5. TARTIŞMA

HSK'nın yaş ile ilişkisi düşük ve yüksek riskli alanlarda farklı dağılım göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde HSK 50 yaşından sonra daha sık görülmektedir. Oysa HSK açısından yüksek riskli coğrafik alanlarda tümör,20'li ve 30'lu yaşlarda da sık görülür (15). Ülkemizin Avrupa ülkelerine coğrafi yakınlığı ve HBV taşıyıcılığı açısından komşu ülkelere benzerliği göz önüne alındığında, HSK'nın yaş açısından insidansı, orta insidans grubunda yer almaktadır (14).

Arhan ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada hastaların yaş ortalaması 60,6'dır(39-83 arasında)(22). Özer ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise hastaların yaş ortalaması 61'dir (23). Zeynep Nurkabal'un çalışmasında incelenen olguların yaşları 11-76 arasında değişmekteydi ve yaş ortalaması 53,47'dir (14). Bizim çalışmamızda ise HSK olguları 14-84 yaş arasında değişmekteydi ve yaş ortalaması 58 idi. 69 HSK vakasından 2' si (%2,89) hariç 67' si (%97,10) 30 yaşın üstündeydi. Serimizdeki HSK olgularının %85,5'i (59 kişi) erkek, %14,5'i (10 kişi) kadındı. Yaptığımız çalışma ülkemizdeki diğer çalışmalarla ve gelişmiş ülkelerdeki HSK olgularının yaşlarıyla benzerlik göstermekteydi (14, 22, 23)

Erkekler HSK gelişiminde önemli derecede risk taşımaktadır(14). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2002 verilerinde HSK'nın Doğu Asya'da (Çin ve Japonya) erkeklerde 100000'de 50-25, Avrupa'da ve İtalya'nın bazı bölgelerinde 100 000'de yaklaşık 25'e ulaştığı bildirilmiştir. Aynı bölgeler için kadınlarda da benzer dağılım bulunmaktadır, bununla beraber en yüksek oran, yaklaşık 100 000'de 14 civarındadır (11). Erkek baskınlığı her yerde gözlemlenirken E/K oranı düşük insidanslı alanlarda 4,1 olup yüksek insidanslı alanlarda bu oran 8,1'dir. Arhan ve ark.'nın yapmış olduğu

çalışmada bu oran 7,1'dir (22). Özer ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada E/K oranı 4,1 olarak bulunmuştur(23). Bizim çalışmamızda ise bu oran 5,9 saptanmıştır.

HSK lenfatik ve hematojen yolla yayılabilir. Portal ven üzerinden intrahepatik yayılım siktir ve tümör büyüklüğü arttıkça sıklığı da artar. Otopsi çalışmalarında % 70 oranında tümörün portal ven ve dallarını infiltre ettiği gösterilmiştir (14). Arhan ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada % 8,2 'sinde portal ven tümör trombusu tespit edilmiştir (22). Farklı yayınlarda HSK hastalarında portal ven tümör trombus sıklığı % 13,4 ve %43,8 olarak bildirilmiştir. Zeynep Nurkabal'un çalışmasında olguların % 59,7'sinde anjiolenfatik invazyon, %14,6'sında perinöral invazyon, %23,1'inde büyük portal ven veya hepatik ven invazyonu, %23,1'inde kapsül invazyonu mevcuttur (14).

Bizim HSK vakalarımızın 24'ünde (%34,8) lenfovasküler invazyon ve 2'sinde (%2,9) lenf düğümü metastazı izlenmiştir. Serimizde literatürle benzer olarak ileri yaşlarda görülen ve çapı büyük tümörlerde lenfovasküler invazyon ve lenf düğümü metastazı daha yüksek oranda izlenmiştir (14, 22, 23).

KK vakalarımızın yaşları 58-83 arasında değişmekteydi (ortalama yaş 68,26). Yurtdışı çalışmalarında olguların çoğu bizimle uyumlu olarak 60 yaşından sonra ortaya çıktığını göstermiştir (13).

Çalışmamızda KK olgularının 9'u erkek (%60) , 6'sı kadındı. E/K oranı 1,5 olarak hesaplandı. Yapılan çalışmalarda bizim çalışmamıza benzer olarak KK insidansının yaşla arttığını ve kadın ve erkekteki sıklığının benzer olduğu bulunmuştur (16, 17).

KK'da portal ven ve dallarına invazyon HSK'da olduğu kadar yaygın değildir ancak oluşabilir (13). KK'lar lokal olarak portal alana yayılır ve hem bölgesel lenf nodlarına hem de uzak organlara metastaz yapabilir (13).

Çalışmaya dahil edilen 15 KK vakasının 5'inde (%33,3) lenfovasküler invazyon izlenmiştir. 10 vakada (% 66,7) izlenmemiştir. Lenf düğümü metastazı ise 15 KK vakasının 2'sinde (%13,3) mevcut, 13 vakada (% 86,7) izlenmemiştir.

HSK ile KK arasında lenfovasküler invazyon açısından kıyaslama yapıldığında net bir fark izlenmemiş olup sonuçlar birbirine yakındır.

Bizim çalışmamızda 31 düşük dereceli displazi olgusunun 28'i erkek, 3'ü kadındı. E/K oranı 9.3 olarak hesaplandı. 6 yüksek dereceli displazi olgusunun 5'i erkek, 1'i kadındı.E/K oranı 5 bulundu. YDDO ve DDDO vakaları HSK için prekürsör kabul edildiğinden HSK ile benzer olarak erkek dominantlığı gösteriyordu (6).

HSK tanı ve ayırıcı tanısında Glipican-3, HSP70, Glutamin sentetaz, CD34, Arginaz-1 gibi çeşitli immünohistokimyasal belirteçler bulunmakla birlikte kesin bir konsensus yoktur (1, 6, 24-28).

Spink 1 pek çok dokuda tanımlanmış olmakla birlikte fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Marshall ve arkadaşlarının Spink 1 gen ekspresyon çalışmasında normal karaciğer hücreleri, sirotik ve makrorejeneratif nodüllerde ekspresyon saptanmamış ancak büyük safra duktuslarının lümenal yüzeyinde pozitiflik bildirilmiştir (2). Bizim çalışmamızda kontrol grubu olan normal karaciğer örneklerinin sadece 2'sinde (%10) boyanma izlenmiştir. Boyanan alanlar çoğunlukla santral ven çevresi ve büyük safra duktuslarının luminal yüzeyleridir. Y-C. Lee ve arkadaşları da tümör dışı karaciğerlerde %3.5 sıklıkta TATI mRNA overekspresyonu bildirmişlerdir (7). Çalışmamız diğer çalışmaların sonuçlarıyla kıyaslandığında çok da farklı çıkmamıştır.

Spink 1 ekspresyonunun HSK' da karsinogenez ve metastatik potansiyel ile ilişkili ve ayrıca tanısal rolü olduğu bildirilmektedir (1, 2, 7, 29). %5 ve %5' in altı sitoplazmik boyanma negatif değerlendirildiğinden çalışmamızda 69 HSK olgusunun 54'sinde (%78) Spink1 pozitif bulunmuştur. Marshall ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu oran (%79) olarak bildirilmiştir (2). Holah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Spink 1 ekspresyonu HSK' ların % 76,3'ünde saptanmış (1); bizim çalışmamızla Marshall ve Holah' ın yaptığı çalışma sonuçları koreledir.

Marshall ve ark.'nın yaptığı çalışmada Spink1 ekspresyonunun tümör çapı, vasküler invazyon ve tümör derecesi (grade) ile ilişkisi gösterilememiş ve Spink 1'in HSK'da sadece tanısal belirleyici olduğu, prognostik öneminin olmadığı vurgulanmıştır (2).

Y-C. Lee ve arkadaşlarına ait bir çalışmada ise Spink1 kan değerleri HSK tümör çapıyla korele bulunmuş; Spink1(TATI) overekspresyonu çapı, büyük tümörlerde, kötü diferansiasyonda ve vasküler invazyon içeren ileri evre HSK'larda artmış olarak bildirilmiştir (7).

F. Li ve ark.'nın HBV ilişkili HSK olgularında immünohistokimyasal olarak FOXP1 ve Spink1'i değerlendirdiği çalışmada parakanseröz sirotik dokuyla kıyaslandığında FOXP1 ve Spink1 protein ekspresyonunun HSK da belirgin olarak artmış olduğu izlenmiş; bu 2 belirtecin tümör büyümesi ve invazyonda, HBV sirozundan HSK gelişiminde kritik rol oynadığı sonucuna varılmıştır (29). Bizim çalışmamızda tümör çapı ve tümör derecesi(grade) değerlendirilmemiştir.

Holah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 13 adet yüksek dereceli displastik nodül vakasının 11' inde boyanma görülmemiştir ve iyi diferansiye HSK ve YDDO ayırımında Spink 1 %83,3 sensitivite ve %84,6 spesifiteye sahip olduğu belirtilmiştir (1). Bizim çalışmamızda Spink1 ile DDDO olgularında %32, YDDO olgularında %83 boyanma izlenmiş olup HSK-YDDO vakaları arasında boyanma sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p=1$). Sonuç olarak çalışmamızda Spink1, HSK ve YDDO ayırıcı tanısında yardımcı olmamıştır. Çalışmamızın Holah ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumsuz olması bizim çalışmamızda YDDO ve onların çalışmasında YDDN kullanılması ve vaka sayımızın onlara göre daha az olması, olabilir.

Marshall ve ark.'nın yaptığı çalışmada Spink1 ile 7 DDDN vakasından 6'sında(%85) boyanma izlenmemiştir (2). Bizim çalışmamızda ise 31 adet DDDO vakasının 21' inde (%68) boyanma izlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar çok farklı değildir; Marshall ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzer olarak Spink1 boyanması HSK'un DDDO ($p=0,0001$) ve normal karaciğer dokusuyla ($p=0,0001$) ayırımında anlamlı bulunmuştur.

Spink1'in boyanma varlığı DDDO ve YDDO arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p=0,031$). DDDO ve normal karaciğer dokusu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0,093$). YDDO ve normal karaciğer dokusunda Spink1 boyanması istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($p=0,0001$).

İngilizce literatürde KK'da Spink1 ile ilgili çok az çalışma mevcuttur (8). Tonouchi ve arkadaşlarının intrahepatik KK' larda immünhistokimya ve DNA microarray teknikleri ile Spink1(PSTI)'i araştırdığı çalışmada; Spink1(PSTI)'nin KK hastalarında cerrahi rezeksiyon sonrası artmış erken rekürrens riskini saptamada potansiyel belirleyici olabileceği bildirilmiştir (8).

Bizim çalışmamızda KK olgularının Olguların 13 tanesinde(%87) boyanma izlenirken 2'sinde (%13) boyanma izlenmemiştir. KK ve normal karaciğer dokusu karşılaştırıldığında Spink1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılıkta saptanmış ($p=0,0001$); HSK ile kıyaslandığında ise istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0.394$). HSK ile istatistiksel anlamlı fark izlenmemesi beklenildiği üzere Spink1' in normal safra duktuslarını boyaması ve nihayetinde bunlardan köken alan KK' yı da boyayacağıdır. Çalışmamızdaki KK olgularının tamamı intrahepatik KK olup prognoz açısından değerlendirme yapılmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada Spink1 ile HSK-KK ve HSK-YDDO vakaları arasında boyanma sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0.394$, $p=1$). Bu nedenle Spink1'in HSK, KK ve YDDO ayırıcı tanısında yardımcı olamayacağı sonucuna varılmıştır. Spink1 boyanmasının hem HSK'un DDDO ($p=0,0001$) ve normal karaciğer dokusuyla ($p=0,0001$) ayırımında hem de DDDO ve YDDO ayırımında istatistiksel anlamlı farklılık gösterdiği ($p=0,031$) saptanmıştır. Hem HSK varyantları, vasküler invazyon ve tümör boyutu gibi diğer histopatolojik parametreler ve Spink1 ekspresyonunun ilişkisi; hem de KK ve Spink1 ekspresyonunun ilişkisi değerlendirilmesi açısından daha geniş ve prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Spink1 ile HSK-KK ve HSK-YDDO vakaları arasında boyanma yaygınlığı açısından istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0.394$, $p=1$). Spink1'in HSK, KK ve YDDO ayırıcı tanısında yardımcı olamayacağı sonucuna varılmıştır. Spink1 boyanmasının HSK'un DDDO ($p=0,0001$) ve normal karaciğer dokusuyla ($p=0,0001$) ayrımında ve DDDO ve YDDO ayrımında anlamlı farklılık gösterdiği ($p=0,031$) saptanmıştır.

HSK, displastik karaciğer lezyonları ve KK da Spink1 ekspresyonunun ilişkisinin değerlendirilmesi açısından daha geniş ve prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

HSK tüm dünyada 6. sıklıkta görülen kanserdir. HSK ayırıcı tanısında displastik lezyonlar önemli bir tanı sorunu oluşturmaktadır. KK karaciğerin 2. sıklıkta görülen primer kanseridir.

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2010-2015 yılları arasında tanı almış HSK(69), KK(15), DDDO(31) ve YDDO(6) olgularında immünohistokimyasal olarak Spink1(TATI) çalışılmıştır.

Spink1 ile HSK-KK ve HSK-YDDO vakaları arasında boyanma sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0.394$, $p=1$). Spink1'in HSK, KK ve YDDO ayırıcı tanısında yardımcı olamayacağı sonucuna varılmıştır. Spink1 boyanmasının HSK'un DDDO ($p=0,0001$) ile normal karaciğer dokusuyla ($p=0,0001$) ayırımında ve DDDO ile YDDO ayırımında istatistiksel anlamlı farklılık gösterdiği ($p=0,031$) saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler Karsinom, Kolanjiyokarsinom, yüksek dereceli displastik odak, düşük dereceli displastik odak, Spink1

8. SUMMARY

HCC(hepatocellular carcinoma) is the most common 6th cancer seen in all around the world. Dysplastic lesions are a source of diagnostic difficulty in HCC differential. CC is 2nd most commonly seen primary liver cancer.

In this study, Spink1(TATI) is used immunochemically for patients who were diagnosed with HCC(69), CC(15), LGDF(31) and HGDF(6) at Inonu University Pathology Department between 2010 and 2015.

There is no significant statistical difference seen between HCC - CC and HCC - HGDN in terms of staining rate($p=0.394$, $p=1$). It is concluded that Spink1 does not help with the differential diagnosis of HCC, CC and HGDN. It is shown that Spink1 stain makes a significant distinction($p=0.031$) of HCC with LGDN($p=0.0001$) and normal liver tissue($p=0.0001$), and also with LGDN and HGDN.

Key words: Hepatocellular carcinoma, Cholangiocarcinoma, High grade dysplastic focus, Low grade dysplastic focus, Spink1

KAYNAKLAR

1. Holah N, El-Azab D, Hayam A. E, Aiad S, Dina M The Diagnostic role of spink1 differentiating hepatocellular carcinoma from nonmalignant lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016; 0:1-9
2. Marshall A, Lukk M, Kutter C, Davies S, Alexander G. Global gene expression profiling reveals spink1 as a potential hepatocellular carcinoma marker *PLOS One* 2013; 8:1-14
3. Halima B, Bahri O, Maamouri N, Imed C, Nissaf A, Sadraoul A, Azaiez O, Azouz M, Nabyl M, Triki H Serological and molecular expression of hepatitis B infection in patients with chronic hepatitis C from Tunisia, North Africa, *Virology Journal* 2010; 229:1-6
4. Wee A, Ludwig J, Robert J, Larusso N, Coffey R, Wiesner R Hepatobiliary carcinoma associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis. *Human Pathology*, 1985; 16:719-26
5. Chalasani N, Baluyut A, İsmail A, Zaman A, Sood G, Ghalib R, Cashland TM, Reddy KR, Zervos X, Anbari MA, Hoen H, Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: A multicentercase control study *Hepatology*. 2000; 31:7-11
6. Park Y.N, Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinoma, *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:704-15
7. Lee Y.C, Pan H, Peng S, Lai P, Kuo W, Ou Y, Hsu H Overexpression of tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) enhances tumour growth and is associated with portal vein invasion, early recurrence and a stage-independent prognostic factor of hepatocellular carcinoma, *European Journal of Cancer* 2007; 43:736-44
8. Tonouchi A, Ohtsuka,M, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Kato M, Nimura Y, Iwase K, Hiwasa T, Seki N, Takiguchi M, Miyazaki M Relationship between pancreatic secretory trypsin inhibitor and early recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma following surgical resection *American Journal of Gastroenterology* 2006 101 1601-10
9. Sibulesky L, Normal liver anatomy, *Clinical Liver Disease* 2013; 2:1-3
10. Arief A, Thung S, Liver **in**:Stacey E. Mills *Histology for Pathologists* 2012 4. Edition, China, 733-56

11. N.D. Theise, M.P. Curado, S. Franceschi, P. Hytioglou, M. Kudo, Y.N. Park, M. Sakamoto, A. Wee, Hepatocellular carcinoma, **in**:Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N *World Health Organization*, 2013, France 205-206
12. Bartosch B, Hepatitis B and C Viruses and Hepatocellular Carcinoma, *Journal Viruses* 2010; 2:1504-09
13. V. J. Desmet, Juan Rosai, Liver **in**:Juan Rosai *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 2011, 10. Edition China 857-965
14. Z. Nurkabal. Danışman: E. Şamdancı Rezeksiyon uygulanmış primer karaciğer kanserlerinin patolojik özellikleri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Malatya İnönü Üniversitesi 2011
15. Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L, David E, Colombo M Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: The histology report, *Editrice Gastroenterologica Italiana* 2011; 43:361-72
16. Çoban Ş, Başar Ö, Ertuğrul İ Kolanjiokarsinom, *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 2007; 17:173-83
17. Boris R. A. Blechacz, Gregory G Cholangiocarcinoma, *Clinics in Liver Disease* 2008; 12:131-50
18. Sean K. Lau, Sonam Prakash, Stephen A. Geller, Randa A, Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma *Human Pathology* 2002; 33:1175-81
19. Wang G, Xu C, Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor: More than a trypsin inhibitor *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2010; 1:85-90
20. Paju A, Stenman Biochemistry and clinical role of trypsinogens and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Crit Rev Clinical Laboratory Science*. 2006; 43:103-42
21. Itkonen O, Stenman UH, TATI as a biomarker, *Clinica Chimica Acta* 2014; 431:260-9
22. Mehmet A, Meral A, Mehmet İ, Mesut Y, Sabite K, Bilge T, Nurgül Ş Tek merkeze ait hepatoselüler karsinom verileri; retrospektif çalışma *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 2009; 8:18-23
23. Birol Ö, Ender S, Uğur Y, Yüksel G, Özlem S, Fazilet K, Sedat B Hepatosellüler karsinomun klinikopatolojik özellikleri ve risk faktörleri: Türkiye'nin güney bölümünde tek merkez sonuçları *The Turkish Journal of Gastroenterology* 2003; 14:85-90

24. Feng M, Ho M, Glypican-3 antibodies: A new therapeutic target for liver cancer, Federation of European Biochemical Societies 2014; 588:377-82
25. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, Montorsi M, Torzilli G, Tommasini M, Terracciano L, Tornillo L, Vecchione R, Roncalli M Diagnostic value of HSP70, Glipican 3, and Glutamine Synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis 2007; 45:725-34
26. Enan T, El-Hawary A, El-Tantawy D, Abu-Hashim M, Helal N Diagnostic role of Glypican 3 and CD34 for differentiating hepatocellular carcinoma from nonmalignant hepatocellular lesions Annals of Diagnostic Pathology 2013; 17:490-3
27. Geramizadeh B. Seirfar N Diagnostic value of Arginase-1 and Glypican-3 in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and metastatic carcinoma of liver Hepat Monthly 2015; 15:1-7
28. Tacha D. E, Yu C, Zhou D Haas T A novel rabbit monoclonal antibody Arginase-1 is highly specific and highly sensitive in hepatocellular carcinoma. Journal of Histotechnology 2015; 38:128-34
29. Fei Li, Ting Liu, Chun-Yung X, Jing-Xia, Lun-Gen L, Xu M FOXP1 and Spink1 reflect the risk of cirrhosis progression to HCC with HBV infection Biomedicine and Pharmacotherapy 2015; 72:103-8