

Deneyssel olarak oluşturulan karaciğer sirozunda ve normal karaciğer dokusunda immunohistokimyasal olarak İto hücrelerinin değerlendirilmesi

The immunohistochemical assessment of Ito cells in normal and experimental liver fibrosis

Dr. Gülay ÖZBİLİM¹, Dr. Tekinalp GELEN¹, Dr. Zafer CANTÜRK², Dr. Mustafa TUNÇ¹,
Dr. Figen SARGIN¹

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı¹, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı²

ÖZET: Normal ve fibrotik karaciğer dokusunda ekstraselüler matriks komponentlerinin depolanmasındaki selüler ve moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Yağ depolayan hücreler veya lipositler olarak da bilinen İto hücreleri, fibrozis oluşmasında büyük bir rol oynamaktadır. Aktive olan İto hücreleri normal ve fibrotik karaciğerde başlıca kollagen üreten hücre tipidir.

Sunulan çalışma normal ve fibrotik karaciğer dokusunda İto hücrelerinin varlığını araştırmak amacıyla yapıldı. Bu deneyssel çalışmada 17 rat kullanıldı. Yedi rat kontrol grubu olarak ayrıldı. Onuna ise CCl₄ verilerek karaciğer fibrozisi oluşturuldu. Daha sonra tüm ratlara otopsi yapılarak karaciğerleri total olarak çıkarıldı. Parafin kesitlere immunohistokimyasal olarak laminin, tip IV kollagen, desmin ve vimentin boyamaları yapılarak İto hücreleri değerlendirildi. Sonuç olarak, İto hücrelerinin lamininle spesifik olarak boyanma gösterdiği izlendi.

Anahtar sözcükler: İto hücreleri, normal ve deneyssel karaciğer fibrozisi

SUMMARY: The cellular and molecular mechanisms involved in the deposition of extracellular matrix components in both normal and fibrotic liver are still poorly understood. Ito cells (also called fat-storing cells or lipocytes), the principal cells residing in the Disse space, are considered to have great potential for fibrogenesis. Activated Ito cells are considered to be the main collagen producing cell type in normal and fibrotic liver.

The aim of this study was to investigate the presence of the Ito cells in normal and fibrotic liver tissue. In this experimental study, 17 rats were used. Seven rats were used as control group. In the other 10 rats, carbon tetrachloride (CCl₄) was used for experimental induction of liver fibrosis. Autopsy was performed on all of the rats and liver tissues were totally removed. Ito cells were evaluated by immunohistochemical staining of laminin, type IV collagen, desmin and vimentin on paraffin sections. It was observed that Ito cells were specifically stained with laminin.

Key words: Ito cells, normal and experimental liver fibrosis

Karaciğerde fibrozis gelişimi özellikle kronik karaciğer hasarı sonucu oluşmaktadır. Fibrozis ile karaciğer içi kan akımının bozulmasını siroz gelişmesine de, portal hipertansiyona yol açabilir (1).

Karaciğer fibrozisinin morfolojik bulguları; normal ve dejenere hepatositler çevresinde, interstisyumda ve Disse aralığında kollagen birikimidir (2). Deneyssel çalışmalarda perivenüler alanlarda miyofibroblast artışı ve kollagen birikimi birlikte görülmektedir (2, 3).

Karaciğerde oldukça az sayıda bulunan fibroblast-

lardan dolayı uzun yıllardır matriks proteinleri tam olarak anlaşılamamıştır. *In vitro* kültür sistemleri, immunoelektronmikroskopi ve *in situ* hibridizasyon teknikleri ile hepatositlerin bazı matriks proteinlerini sentezlediği anlaşılmıştır. Ekstraselüler matriksin yapılanmasında perisinüzoidal hücreler olan İto hücreleri (lipositler), perisinüzoidal (Disse) alanda yerleşen bol miktarda sitoplazmik retinoid ihtiva eden hücrelerdir. Karaciğer hasarında proliferatif olarak retinil esterlerini kaybeder ve endoplazmik retikulum hipertrofisi göstererek myofibroblastta benzeyen hücrelere dönüşürler ve matriks proteinleri sentezlerler (4).

Ekstraselüler matriksin iki ana elemanı; yapısal glikoproteinler (kollagen, elastin, laminin, fibro-

Tablo 1. Karaciğer fibrozisi oluşturan nedenler

Toksik Nedenler	: CCl ₄ , dimetilnitrozamin (DMNA) - Thioacetamide (TAA)
Beslenmeye bağlı faktörler	: Yüksek yağ, düşük protein diyeti
İmmunolojik	: Heterolog serum, endotoksin, schistosomiasis, bakteri hücre duvarı
Bilier	: Safra duktuslarının tıkanıklığı
Alkolik	: Etanol içeren likit diyet
Genetik	: Otozomal resessif genle geçiş

nektin) ve proteoglikanlardır. Normal insan karaciğerinde total proteinin % 4'ü kollagendir. Bunun % 53'ü tip I, % 47'si tip III kollagendir. Sirotik karaciğerde ise total proteinin % 10'u kollagen (% 75'i tip I ve % 25'i tip III kollagen) dir. Normal rat karaciğerinde ise total proteinin % 0.55'i kollagen olup (% 60 tip I, % 40 tip III kollagen), CCl₄ etkisi ile gelişen sirozda bu oran % 2'ye yükselir. Kollagen oranları değişmez. Normal rat karaciğerinde tip I kollagen karaciğer kapsülünde, portal stromada ve Disse aralığında, tip IV kollagen duktal, nöral ve vasküler bazal membranlar ile sinüzoid duvarında yer alır. Başlıca kaynağı İto hücreleri olan laminin ise tip IV kollagen ile beraber bütün bazal membranlarda bulunur. Ayrıca vasküler endotelial hücreler, safra duktus hücreleri ve sinüzoidal endotel hücrelerinde de görülmektedir (5-7).

Bu yüzyılın başlarından beri birçok araştırmacı özellikle insanlarda gelişen karaciğer fibrozisine benzer bir deneysel hayvan modeli ortaya çıkarmaya çalışmaktadır. Hayvan modellerinde geliştirilen karaciğer fibrozislerinde çeşitli etyolojik faktörler rol oynamaktadır (Tablo 1) (4).

Bu çalışmada CCl₄ ile karaciğer fibrozisi oluşturuldu. Normal ve fibrotik karaciğer dokusunda immunohistokimyasal yöntemlerle laminin, tip IV kollagen, desmin ve vimentin boyanma özellikleri değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

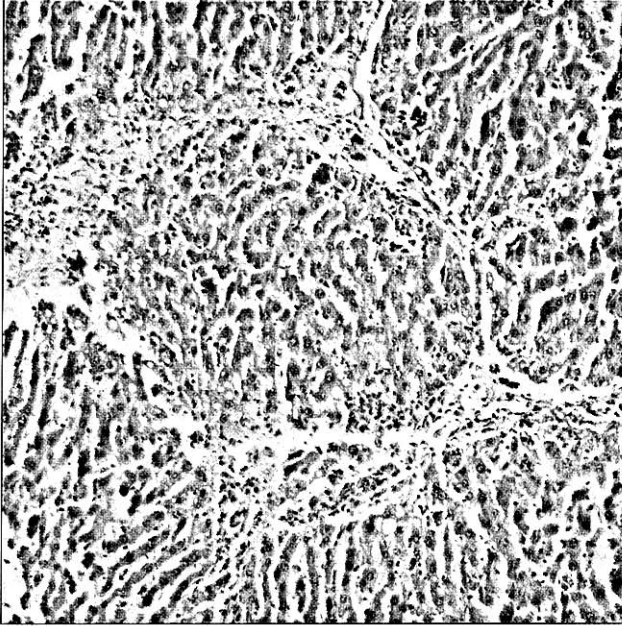
Bu deneysel çalışmada 17 adet rat kullanıldı. Ratların ortalama ağırlıkları 200 g olup, tüm ratlar uygun koşullarda 12 hafta süre ile standart rat yemi ile beslendi. Yedi rat kontrol grubu olarak seçilerek (1. grup) hiçbir işlem uygulanmadı. Ratların 10 tanesine ise 12 hafta süreyle haftada iki kez, zeytinyağı ile sulandırılarak 0.2 mL/100 g dozda karbontetraklorür (CCl₄), batın sağ alt ve sol alt kadrantlarına subkütan olarak enjekte edildi (2. grup).

Günümüzde karaciğer fibrozisinin deneysel modellerinin geliştirilmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ratlarda deneysel olarak fibrozis oluşturulmasında en yaygın kullanılan ve en eski ajan olan CCl₄ gastrik lavaj, subkutan enjeksiyon veya inhalasyon yolu ile uygulanabilir (8-10). Bu yöntemlerde fibrozis ve siroz oluşma süreleri farklı olmaktadır. Subkutan uygulamada 6 hafta sonra fibrozis, 12 hafta sonra siroz olduğu bildirilmektedir (4). Çalışmamızdaki olgular da 12 hafta süre ile izlenmiştir.

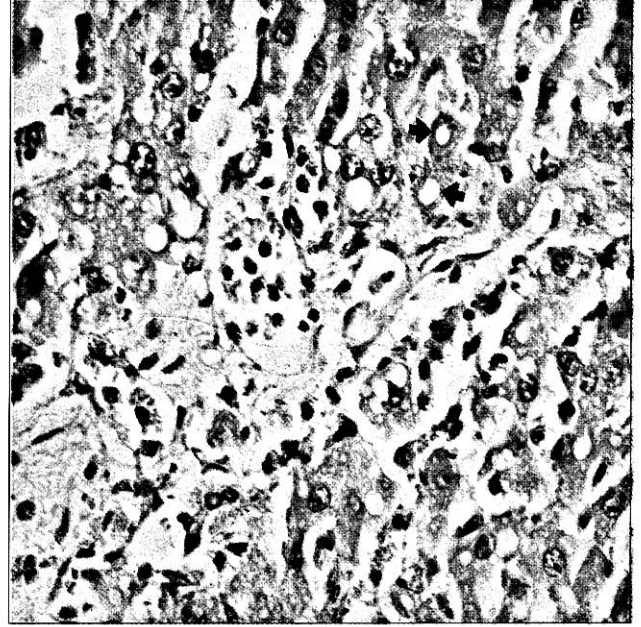
On iki haftanın sonunda tüm ratlara otopsi yapılarak karaciğerleri total olarak çıkarıldı. % 10'luk formalinle tespit edilen dokular, parafin takibe alındı. Beş mikron kalınlığındaki kesitler Hematoxilen-Eozin (HE), Gomori'nin retikulum ve Masson tri-krom histokimyasal boyaları ile boyandı. Ayrıca olgulara avidin-biyotin peroksidaz yöntemi kullanılarak laminin, tip IV kollagen, desmin ve vimentin (DAKO) monoklonal antikorları ile immunohistokimyasal boyamalar uygulandı. Kromojen olarak DAP tabletleri kullanıldı. Sonuçlar ışık mikroskopunda incelenerek koyu kahverengi boyanma alanları pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif boyanma; hafif, orta ve belirgin olarak (+), (++) ve (+++) şeklinde belirtildi.

BULGULAR

Kontrol grubundaki (1. grup) 7 ratın otopsi sonucu çıkarılan karaciğer dokularında makroskobik bir özellik görülmedi. CCl₄ verilen gruptaki (2. grup) 10 rattan 4'ünde kesit yüzünde küçük nodüller yapılar, mikroskobik incelemede ise siroz gelişimi izlendi (Resim 1). Kontrol grubundaki olguların ikisinde portal alanda minimal (+) mononükleer yangı, bir olguda konjesyon ve üç olguda hepatositlerde bulanık şişme ile karakterli dejeneratif değişiklikler izlendi. CCl₄ verilen gruptaki 4 olguda tam olarak gelişmiş rejenerasyon nodülleri, 6 olguda ise tam gelişmemiş (inkomplet) nodül yapıları, portal alanlarda orta derecede ve belirgin bağ



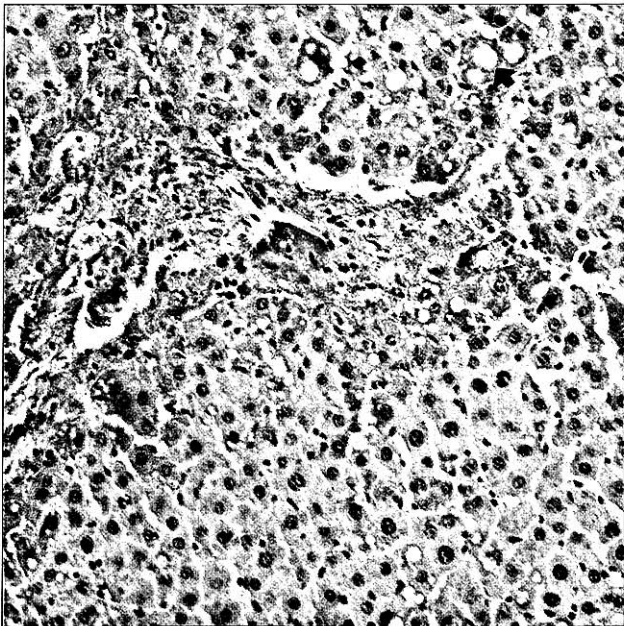
Resim 1. CCl₄ verilen grupta oluşturulan karaciğer sirozu (HE x 10)



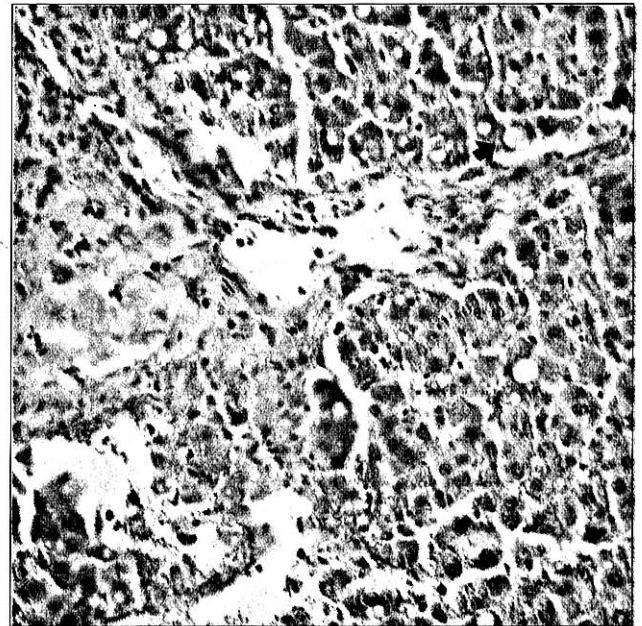
Resim 2. CCl₄ verilen grupta İto hücrelerinin görünümü (HE x 40)

dokusu artışı, 7 olguda yağlanma, 6 olguda portal alanda orta derecede mononükleer yangı ve Kuppfer hücre hiperplazisi ile belirgin konjesyon izlendi. Ayrıca bu olgularda safra duktus epitellerinde, damar duvarlarında ve hepatositlerde dejeneratif

değişiklikler görüldü. Tablo 2'de 1. ve 2. gruptaki olguların histopatolojik bulguları sunulmuştur. Kontrol grubundaki 7 olgunun 2'sinde ve diğerd gruptaki 10 olgunun 6'sında perisinüzoidal ve hepatositler ile sinüzoid endotelleri arasındaki alan-



Resim 3. Tip IV kollagenle İto hücreleri, dejenere hepatositler, bağ dokusu ve portal alanlarda (++) boyanma (Tip IV kollagen, Dako, ABC x 20)



Resim 4. Lamininle İto hücreleri, sinüzoid endotelleri ve periportal dejenere hepatositlerde (++) boyanma (Laminin, Dako, ABC x 20)

	1. Grup	2. Grup
Komplet rejenerasyon nodülleri	--	4 olguda (+)
İnkomplet rejenerasyon nodülleri	--	6 olguda (+)
Portal alanlarda bağ dokusu artışı	--	(++), (+++)
Yağlanma	--	5 olguda mikroveziküler, 2 olguda makroveziküler.
Portal alanda yangı	+	(++)
Kupffer hücre hiperplazisi	--	(++)
Konjesyon	++	(+++)
Dejeneratif değişiklikler	+	Safra duktusları, damar duvarları ve hepatositler (++)

Tablo 2. Kontrol grubu (1. grup) ve CCl₄ ile karaciğer fibrozisi oluşturulan (2. grup) olgularda saptanan histopatolojik bulgular

larda, oval yuvarlak nükleuslu, geniş berrak sitoplazmalı İto hücreleri dikkati çekti (Resim 2).

İmmunohistokimyasal boyamalarda kontrol grubundaki iki olguda saptanan İto hücrelerinin lamininle, birinin ise tip IV kollagenle boyandığı izlenmiştir. CCl₄ verilen grupta ise; 6 olguda saptanan İto hücrelerinin tümü lamininle (++), 4 olgu tip IV kollagenle (++), 3 olgu desmin ile (+), vimentin (-) olarak değerlendirilmiştir (Resim 3 ve 4).

İkinci gruptaki olguların avidin-biotin peroksidaz yöntemi ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarının sonuçları Tablo 3'te sunulmuştur.

TARTIŞMA

Ekstraselüler matriksin, son yıllardaki çalışmalar ışığında son derece dinamik bir şekilde, hücre diferansiyasyonu, hücrelere bilgi iletme ve hücre ilişkilerini korumakta rol oynadığı belirlenmiştir. Daha önce pasif şekilde karaciğer hasarına bağlı olarak biriktiği düşünülen retiküler fibrozisin sa-

dece yer kaplayan özelliği olmadığı, bunun yanı sıra ekstraselüler matriksin kompozisyonunu değiştirmesi sonucu hepatosit fonksiyonlarını değiştirdiği, hücre hareketi, polarite ve gen ekspresyonlarını etkilediği anlaşılmıştır (1, 11).

Yapılan çalışmalarda CCl₄ uygulamasından sonra görülen histopatolojik bulgular; yağlanma, sentrilobüler alanlarda nekroz, septal ve nonseptal fibrozis sonrası siroz gelişimi olarak bildirilmektedir (4, 8). Ayrıca, bu olgularda İto hücrelerinin varlığı da gözlenmiştir. Deneysel modellerde İto hücreleri beslenme bozukluğu, toksik ve immünolojik etyoloji ile ortaya çıkmaktadır.

Myofibroblastlara dönüşerek fibrozis oluşturan İto hücreleri, kollagen sentezini regüle eden A vitamini de depolamaktadır. Fibrozis arttıkça, karaciğerde A vitamini progressif olarak azalmaktadır (2). İto hücreleri; nonparankimal karaciğer hücreleri olup, perisinüzoidal aralıkta, hepatositler ile sinüzoid endotel hücreleri arasında bulu-

Tablo 3. CCl₄ ile karaciğer fibrozisi oluşturulan ratlarda saptanan immunohistokimyasal bulgular

	<i>Laminin</i>	<i>Tip IV Kollagen</i>	<i>Desmin</i>	<i>Vimentin</i>
Portal alanlar	++	++	++	-
Periportal hepatositler	++	-	++	-
Sinüzoid endotelleri	++	-	-	-
Safra duktusları	+	-	-	-
Dejenere hepatositler	+	++	+	-
Bağdokusu bantları	-	+++	-	+(n=1)
Damar duvarları	-	-	+	-
İto hücreleri	++ (n=6)	++ (n=4)	+(n=3)	-

nurlar. Deforme görünümlü, heterokromatik nükleuslu ve lipid içeriğinden dolayı, geniş berrak sitoplazmalı hücrelerdir.

Bu çalışmada toksik madde 12 hafta süre ile verildikten sonra rat karaciğerleri incelendiğinde, CCl₄'e bağlı rejenerasyon nodülleri ve bağ dokusu artışı izlendi. Ayrıca kontrol grubunda 2 olguda, diğer grupta ise 6 olguda fazla miktarda İto hücresi dikkati çekti. İto hücreleri, ekstraselüler matris proteinlerinin başlıca kaynağı olan laminini de sentezlemektedir. Laminin 850.000 dalton ağırlığında bir glikoproteindir. Disse aralığında vasküler endotelial hücreler ve safra duktus hücreleri çevresindeki yapılarda gözlenir. Normal karaciğerde İto hücreleri ve endotel hücreleri lamininin başlıca kaynağı iken fibrotik süreçlerde laminin artmaktadır. Çalışmamızda CCl₄ ile karaciğer fibrozisi oluşturulan 10 olgudan 6'sında İto hücreleri saptanmış ve tümünde laminin pozitifliği izlenmiştir.

Normal şartlarda tip IV kollagen perisinüzoidal alanlarda, hepatik arterler, portal venler ve safra duktusları çevresinde boyanır (6, 12). Olguları-

mızda portal alanlarda ve nodül çevrelerindeki bağ dokusunda ve İto hücrelerinde tip IV kollagenin boyandığı izlendi. Literatürde fibrotik karaciğerlerde tip I, III, IV ve VI kollagenin arttığı bildirilmektedir (5, 13).

Normal karaciğer dokusunda desmin pozitif hücreler sıklıkla periportal alanlarda (Zon 1) bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda İto hücrelerinin desminle boyanmadığı, ancak myofibroblastik diferansiyasyon gösteren İto hücrelerinin desminle boyandığı belirtilmektedir (3, 14). Bu çalışmada portal alanlarda, periportal alanlarda, damar duvarlarında ve İto hücresi saptanan 6 olgunun 3'ünde desmin pozitifliği saptandı. Vimentin ise fibrotik karaciğer grubundaki olguların sadece 1'inde portal alanlarda boyanma göstermiş, diğer olgularda boyanma izlenmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; deneyisel olarak karaciğer fibrozisi ve sirozu oluşturulan olgularda İto hücreleri immunhistokimyasal olarak değerlendirildiğinde; lamininin spesifik olduğu ve bazı olgularda tip IV kollagen ve desmin ile de İto hücrelerinin boyandığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Burt AD. Liver fibrosis. BMJ 1992; 305:537-8.
2. Mak KIM, Leo MA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in baboons: Transformation of lipocytes to transitional cells. Gastroenterology 1984; 87:188-200.
3. Ballardini G, Groff P, Giorgi LBD, et al. Ito cell heterogeneity: Desmin negative Ito cells in normal rat liver. Hepatology 1994; 19: 440-6.
4. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: A review. Semin Liver Dis 1990; 10(1): 56-65.
5. Loreal O, Levavasseur F, Fromaget C, et al. Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. Am J Pathol 1993; 143: 538-44.
6. Maher JJ, Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM. Immunolocalization of laminin in normal rat liver and biosynthesis of laminin by hepatic lipocytes in primary culture. Gastroenterology 1988; 94: 1053-62.
7. Tsukamoto H, French SW, Benson N. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. Hepatology 1985; 5: 224-32.
8. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. Lab Invest 1986; 53: 166-86.
9. Lopez-Novoa JM, Martinez-Maldonado M. Impaired renal response to splanchnic infusion of hypertonic saline in conscious cirrhotic rats. Am J Physiol 1982; 242: 390-4.
10. Fernandez D, Munoz D, Caramelo C, Santos JC. Systemic and splanchnic hemodynamic disturbances in conscious rats with experimental liver cirrhosis without ascites. Am J Physiol 1985; 249: 316-20.
11. Hernandez AM. The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. Lab Invest 1984; 51(1): 57-74.
12. Clement B, Rescan PY, Baffet G, et al. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver and in primary culture. Hepatology 1988; 8(4): 794-803.
13. Loreal O, Clement B, Schuppan D, et al. Distribution and cellular origin of collagen VI during development and in cirrhosis. Gastroenterology 1992; 102: 980-7.
14. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, et al. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver. Virchows Arch 1994; 424 (3): 249-56.