

Yüksek Doz A Vitamini Uygulanan Sıçan Karaciğer Dokusunda Desmin ve Vimentinin İmmünohistokimyasal Olarak Tanımlanması

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION OF DESMIN AND VIMENTIN IN THE RAT LIVER TISSUE AT HYPERVITAMINOSIS A

Aysel KÜKNER*, Neriman ÇOLAKOĞLU**, Bengü ÇOBANOĞLU***

* Prof.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Araş.Gör.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD,

*** Araş.Gör.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, ELAZIĞ

Özet

Amaç: Çalışmanın amacı, yüksek doz vitamin A verilen sıçan karaciğer dokusunda desmin ve vimentinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesidir.

Materyal ve Metot: Ağırlıkları ortalama 200-250 g olan yetişkin Wistar cinsi erkek sıçanlara, 20mg/kg ve 40mg/kg A vitamini oral gavaj yoluyla 15 gün süre ile verildi. Kontrol grubu normal beslendi. Çalışma süresi sonunda karaciğer dokularından parafin bloklar hazırlandı. 5 µm parafin kesitlere Avidin-Biotin immünperoksidaz tekniği uygulandı. Monoklonal Anti-Human Desmin, D33- Dako, ve Mouse Anti- Vimentin, V9- Dako primer antikorları kullanıldı.

Bulgular: Deney ve kontrol gruplarında desmin (+) immün boyanma izlenmedi. Deney gruplarında, vimentin (+) immün boyanması özellikle Kupffer hücrelerinde kontrole göre artmış olarak gözlemlendi. Kupffer hücrelerinin aktivasyonu 40 mg/kg A vitamini verilen grupta belirgindi ve hücre infiltrasyon alanlarının vimentin ile oldukça yoğun boyandığı dikkat çekti.

Sonuç: Yüksek doz A vitamininin karaciğer dokusunda Kupffer hücre aktivasyonuna neden olduğu gözlemlendi. Ito hücresi aktivasyonu ve fibrozis saptanmadı.

Anahtar kelimeler: A vitamini, Karaciğer, Desmin, Vimentin

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:378-384

Summary

Purpose: The aim of this study was to determine desmin and vimentin immunohistochemically in liver tissue of rats exposed to high dose of vitamin A.

Material and Method: Adult Wistar male rats, weighing 200-250 g, were treated with vitamin A at 20 mg/kg and 40 mg/kg oral gavage, for 15 days. The control groups were fed normally. At the end of the study paraffin blocks were prepared from the liver tissue. Avidin-Biotin Immunoperoxidase technique was applied to 5µm thick paraffin sections. Monoclonal Anti-Human Desmin, D33- Dako, and Mouse Anti-Vimentin, V9- Dako primer antibody were used.

Results: Desmin (+) immun staining was not observed in both experimental and control groups. In experimental groups, vimentin (+) immun staining increased compared to the control group, particularly in Kupffer cells. The activation of Kupffer cells in the group with 40 mg/kg vitamin A was significant and it was also observed that cell infiltration areas was stained intensively with vimentin.

Conclusion: The high dose of vitamin A caused to the activation of Kupffer cells in the liver tissue. No activation of Ito cell and fibrosis were seen.

Key Words: Vitamin A, Liver, Desmin, Vimentin

T Klin J Med Sci 2002, 22:378-384

A vitamini, retinil esterleri formunda birincil olarak karaciğer dokusunda, Disse aralığında bulunan Ito (lipositler, stellate, perisinüzoidal, fat-storing cell) hücrelerinde depolanırlar (1). Bu hücreler, hücre dışı matriks yapım ve yıkımında, sitokinlerin salgılanmasında ve sinüzoid çapının kontrolünde rol oynarlar (2). Elektron mikroskopta, sitoplazmaları lipit damlacıkları ile dolu, granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi organelleri iyi gelişmiş, sitoplazmik uzantıları olan hücreler olarak tanımlanmıştır (3). A vitamini depolayan bu hücrelerin özellikle karaciğer fibrozisinden sorumlu olduğu, sayıca artarak miyofibroblast hücre özelliği kazandığı ve kollajen biyosentezinde artış gösterdiği tespit edilmiştir (4). Kronik karaciğer hastalıklarında hücre dışı matriksteki fibrotik

bileşenlerin en büyük kaynağı Ito hücreleridir (5). Karaciğer fibrozisi, hepatosellüler karsinom ve kronik hepatit sonrası gibi patolojik koşullarda Ito hücrelerindeki A vitamini depolanması azalmakta, kollajen üretimi artmaktadır (6, 7). Bu hücreler kollajen Tip I, III, IV, fibronektin, laminin, heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat sentezleme potansiyeline sahiptir (3).

Ito hücrelerinin karaciğer dokusu dışında, pankreasta asinuslar çevresinde (8), akciğerde alveoller arası septumda, böbrek korteksinde tübüller arasında ve ince bağırsaklarda lamina propriyada da görüldüğü bildirilmiştir (9). Çok nadir olsa da Ito hücrelerinden köken alan tümörler gözlenmiştir (10). Desmin, vimentin, alfa-smooth actin (α -SMA), glial fibriller asidik protein (GFAP),

tubulin immünohistokimyasal olarak Ito hücrelerinde tanımlanmıştır (11, 12). Karaciğerde fibrozis geliştiğinde desmin, alfa-SMA immün reaksiyonu oldukça artmaktadır (11). Ito hücrelerinin tanımlanmasında desmin immün boyanması kullanılabilirliği öne sürülmüş (13) ancak desmin (+) boyanan Ito hücreleri yanında, desmin (-) boyanan Ito hücrelerinin de olduğu, bu hücrelerin heterojenite gösterdiği, bu nedenle desmin immün boyanmasının fenotipik bir ayıracı olamayacağı şeklinde yorumlanmıştır (4). Ito hücrelerinin insanlarda kemiricilere göre farklılık gösterdiği ve desmin (-) reaksiyon verdiği saptanmıştır (14). İn vivo ve invitro koşullarda Ito hücrelerinin tanımlanmasında, glial fibriller asidik proteinin hücreye özel bir işaretleyici olarak kullanılabilirliği görülmüştür (15). Ayrıca laminin de Ito hücreleri için belirleyici bir işaretleyici olduğu bildirilmiştir. Laminin (+) immün reaksiyon gösteren hücreler Ito hücreleri olarak tanımlanmıştır (4).

Desmin ile (+) boyanan Ito hücreleri vimentin ile de boyanmaktadır. Kupffer hücreleri ve endotel hücreleri ise sadece vimentin ile boyanmaktadır (13, 16). Kupffer hücrelerinin vimentin ile (+) boyanması hepatosellüler karsinomlarda artış göstermekte ve bu özellik hastalığın diağnozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (17). Yüksek doz A vitamini karaciğer dokusunda zedelenmeye neden olmakta, Ito ve Kupffer hücrelerinde yapısal değişikliklere yol açmaktadır (18).

Bu çalışmada, farklı yüksek dozlarda A vitamini uygulanmış sıçanların karaciğer dokusunda desmin ve vimentin dağılımının immünohistokimyasal olarak saptanması amacı güdüldü.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada ortalama ağırlıkları 200-250 g olan, toplam 12 adet ergin Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Bir gruba (n=4) 20 mg/kg all-trans-retinoik asit (Vitamin A-acid, Biochem Fluka), 15 gün süre ile ağızdan gavaj kullanılarak verildi. Diğer gruba ise (n=4) A vitamini 40 mg/kg olarak aynı sürede uygulandı. Deneklerin bir bölümü ise normal beslenerek kontrol grubu (n=4) olarak değerlendirildi. Deney süresi sonunda sıçanlardan eter anestezisi altında karaciğer doku örnekleri alındı ve Bouin solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildikten sonra dereceli alkoller ile yıkandı. Rutin ışık mikroskopik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. İmmünohistokimyasal boyama sırasında dokuların dökülmemesi için Polilizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinize edilen kesitler dereceli alkol serilerinden geçirildikten sonra distile su ile yıkandı. Oda ısısında % 0.1 H₂O₂ ile inkübe edildi. PBS ile yıkanarak Avidin-biotin-peroksidaz immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı. Kesitler % 10 luk normal keçi serumu ile muamele edildi. Daha sonra Desmin (Mouse Anti- Human Desmin D33, Dako) ve Vimentin (Mouse

Anti- Vimentin V9, Dako) primer antikoları ve negatif kontrol kesitlerine de PBS solüsyonu uygulandı. + 4°C'de bir gece boyunca inkübe edilen kesitler ertesi gün PBS ile yıkandı. Sekonder antikor, takiben HRP (Horse Radish Peroksidaz) uygulandı. PBS ile yıkanıp DAB kromojen ile boyandı, hematoksilin ile zıt boyama yapıp alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra kapatılıp ışık mikroskopta incelendi. Preparatlar, (-) boyanma yok, (+) zayıf boyanma, (++) orta şiddette boyanma, (+++) kuvvetli immün boyanmış olarak değerlendirildi.

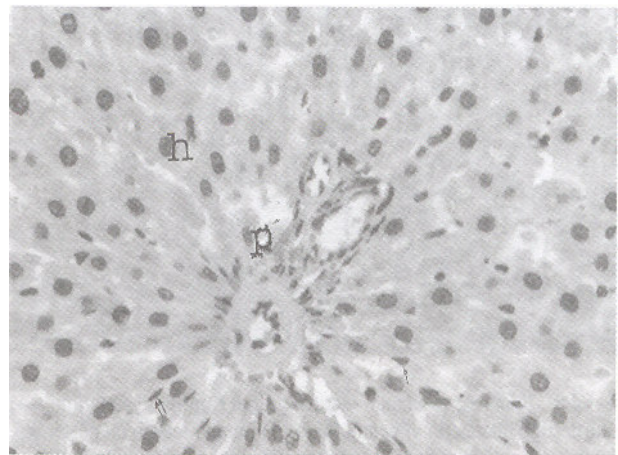
Bulgular

Karaciğer dokusunda desmin ve vimentin immün reaksiyonunun şiddetinin hücrelerde ve portal alandaki dağılımı Tablo 1'de özetlenmiştir.

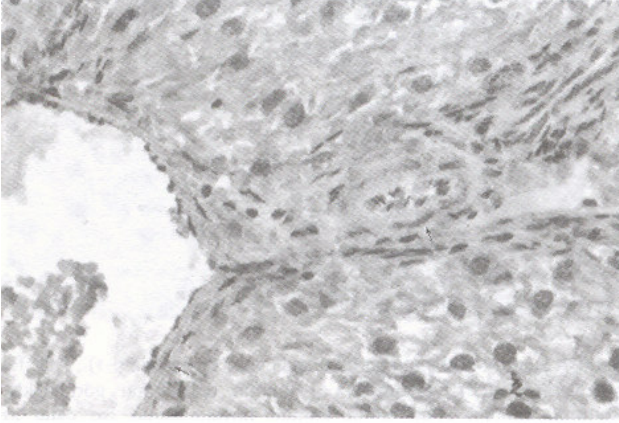
Yüksek doz A vitamini uygulanan gruplarda, özellikle portal alan çevresindeki hepatositlerin etkilendiği, sitoplazmalarının boyanmamış olduğu, v. sentralis çevresinde yer alan hepatositlerin ise normal yapıda olduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Karaciğer dokusunda desmin ve vimentin immün reaksiyon dağılımı. Boyanma yok (-), (+) zayıf boyanma, (++) orta şiddette boyanma, (+++) kuvvetli boyanma.

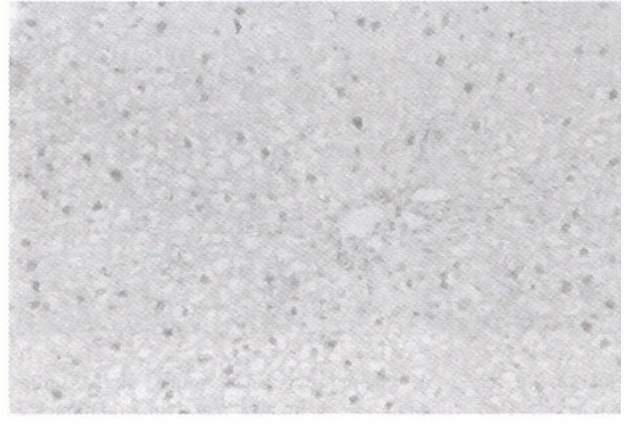
	Desmin		Vimentin	
	Kontrol grubu	Deney grupları	Kontrol grubu	Deney grupları
Kupffer hücresi	-	-	++	+++
Ito hücresi	-	-	?	?
Endotel hücresi	-	-	+ / ++	++
Portal alandaki Arter, ven duvarı	-	+	++	+++
Hücre infiltrasyon alanları	-	-	-	+++



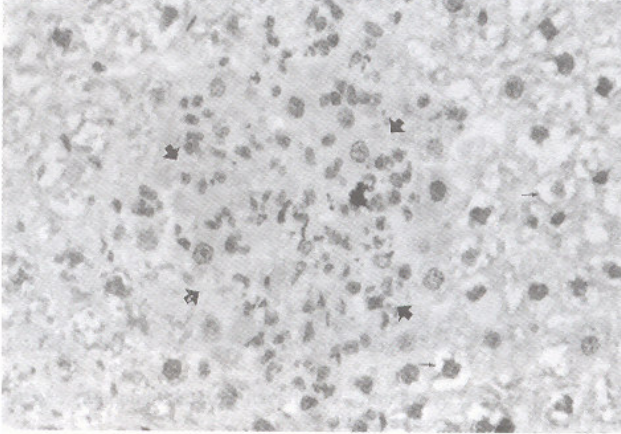
Şekil 1. Kontrol grubu sıçan karaciğer dokusundaki hücrelerde ve portal alanda yer alan yapılarda desmin immün reaksiyonunun olmadığı görülmekte. Portal alan (P), hepatosit (h), endotel hücresi (⇒), Kupffer hücresi (→) X 240.



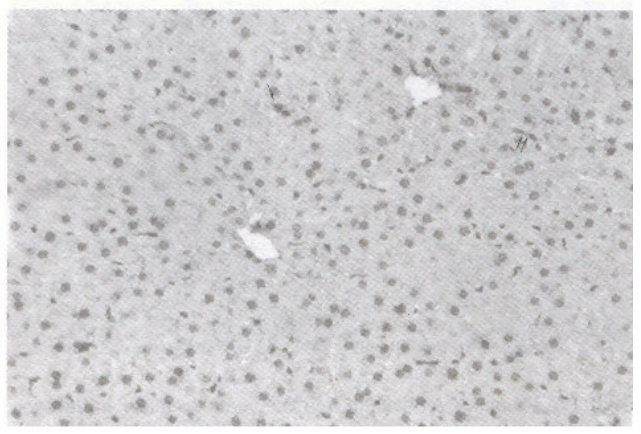
Şekil 2. 40 mg/kg A vitamini uygulanan siçan karaciğer dokusunda desmin immün boyanmasının kontrol grubuna benzediği, hücrelerde immün reaksiyonun olmadığı görülmekte. Portal alanda yer alan arter ve ven duvarında desmin (+) immün reaksiyon izlenmekte (→) X 480.



Şekil 3. 40 mg/kg A vitamini uygulanan siçan karaciğer dokusunda negatif kontrol boyanma ayırt edilmekte x 120.



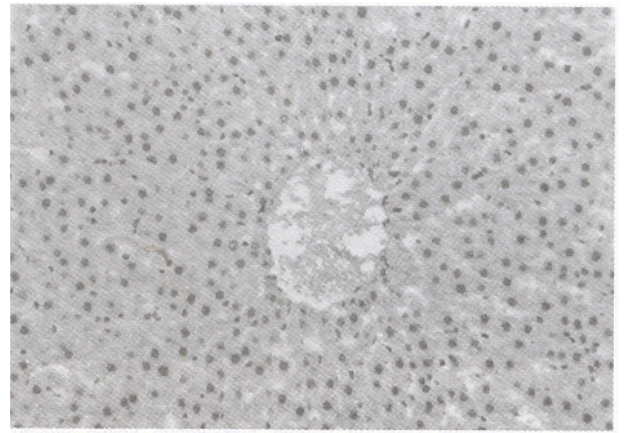
Şekil 4. 40 mg/kg A vitamini uygulanan grupta sıklıkla gözlenen hücre infiltrasyon alanlarında desmin (-) immün reaksiyon görülmekte. Hepatositlerin etkilendiği ve sitoplazmalarının boyanmadığı dikkat çekmekte (→) X 240.



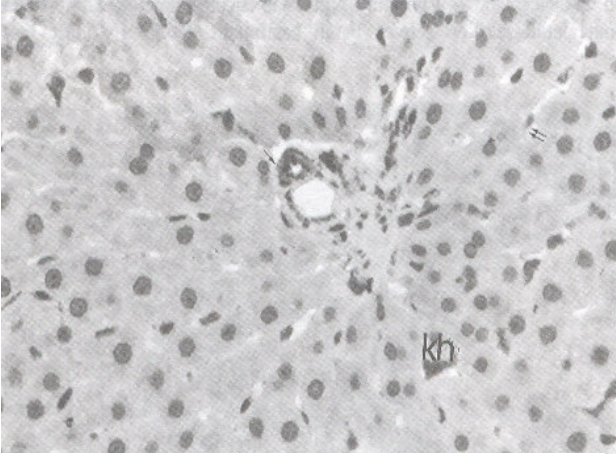
Şekil 5. Kontrol siçan karaciğer dokusunda Kupffer (→) ve endotel (⇒) hücrelerinde vimentin ile (++) şiddetinde immün reaksiyonun olduğu görülmekte X 120.

Desmin ile immün boyama yapılan kontrol (Şekil 1) ve deney (Şekil 2) gruplarının karaciğer dokusunda, sinüzoidler çevresinde yer alan endotel hücrelerinde, Kupffer hücrelerinde immün reaksiyon izlenemedi. Deney gruplarında portal alandaki arter ve ven duvarındaki düz kas hücrelerinde desmin (+) şiddetinde boyanma saptandı (Şekil 2, 3). On beş gün 40 mg/kg A vitamini verilen grupta, hepatositler arasında hücresel infiltrasyon alanları sıklıkla izlendi ve bu alanlardaki hücrelerde desmin immün boyanması negatif olarak tespit edildi (Şekil 4).

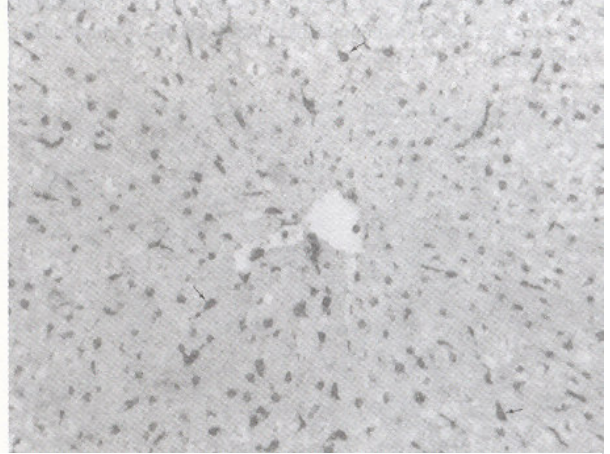
Kontrol grubunda karaciğer dokusunda, v.ventralis çevresinde bulunan sinüzoidlerdeki Kupffer ve endotel hücrelerinde (Şekil 5, 6), portal alanda arter duvarında daha belirgin olarak vimentin (++) immün boyanması izlendi (Şekil 7). Bazı endotel hücrelerinin vimentin (+),



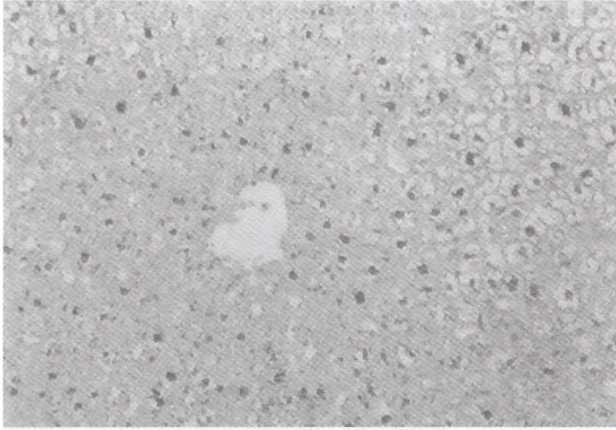
Şekil 6. Kontrol grubuna ait negatif kontrol boyanma izlenmekte x 120.



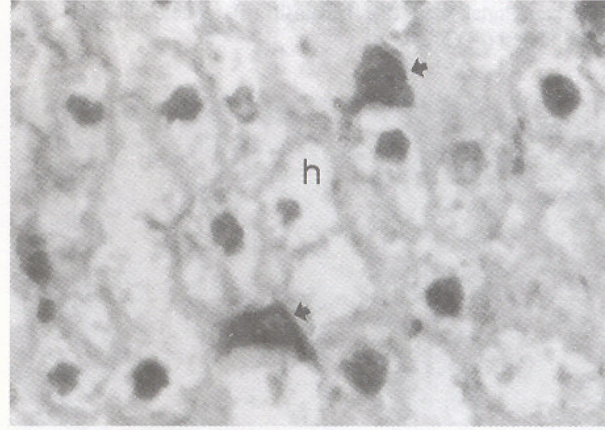
Şekil 7. Kontrol grubunda portal alanda arter duvarında (→), Kupffer hücrelerinde (Kh) vimentin (++) immün reaksiyonu görülmekte. Sinüzoid endotel hücrelerinin immün boyanmasının ise daha az belirgin olduğu izlenmekte (⇒) X 240.



Şekil 8. 20 mg/kg A vitamini verilen grupta Kupffer hücrelerinin (→) aktifleştiği, hücrelerin vimentin ile (+++) immün reaksiyon gösterdiği, hücre yoğunluğunun kontrole göre artmış olduğu görülmekte X 120.

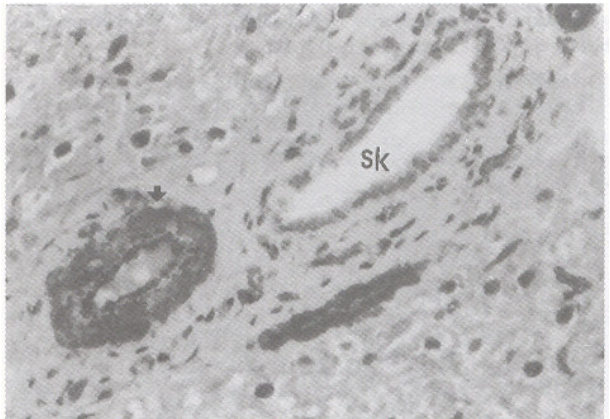


Şekil 9. 20 mg/kg A vitamini uygulanan gruptaki negatif kontrol boyama izlenmekte x 240.

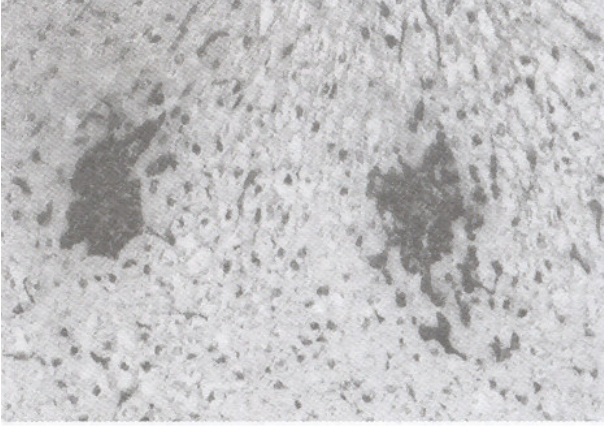


Şekil 10. 40 mg/kg A vitamini uygulanan grupta, aktif Kupffer hücrelerinde (→) vimentin (+++) immün reaksiyonu görülmekte. Hepatosit (h) sitoplazmalarının boyanmadığı ayırt edilmekte X 480.

bazılarının ise (++) immün reaksiyon verdiği gözlemlendi. Sinüzoidlerde vimentin (+) boyanan sitoplazmik uzantıları belirgin olarak seçilen hücrelerin büyük bir bölümü Kupffer hücreleriydi. Portal alan ve v. sentralis çevresindeki hücrelerin boyanma şiddeti benzerdi. Safra kanallarında belirgin bir boyanma tespit edilmedi (Şekil 7). Yüksek doz A vitamini uygulanan her iki deney grubunda da Kupffer hücrelerinin aktive olduğu, kontrol grubuna göre daha yoğun boyandığı (+++) izlendi. Endotel hücrelerinde vimentin (++) immün reaksiyon saptandı (Şekil 8, 9). Kupffer hücrelerindeki yoğun boyanma (+++) hem portal alan çevresinde hem de v. sentralis çevresinde gözlemlendi (Şekil 10). Portal alanların bazılarında özellikle arter yapısında vimentin için immün boyanmanın daha şiddetli (+++) olduğu dikkat çekiyordu. Safra kanalı çevresinde daha az bir boyanma izlendi (Şekil 11). Desmin ile boyanmayan hücresel infiltrasyon alanları, vimentin ile



Şekil 11. Deney grubunda portal alanlardaki arter duvarında vimentin (+++) immün reaksiyonun yoğun olduğu (→), safra kanalı (sk) çevresinde immün reaksiyonun daha az olduğu görülmekte. Endotel hücrelerinde (*) ise vimentin (++) immün boyanma izlenmekte X 480.



Şekil 12. 40 mg/kg A vitamini verilen gruplarda hücre infiltrasyon alanlarının vimentin ile yoğun bir şekilde (+++) immün reaksiyon göstermektedir X 120.

(+++)' şiddetinde oldukça yoğun boyanma gösteriyordu (Şekil 12).

Tartışma

Karaciğer enflamasyonu ve fibrozis gelişiminde Kupffer hücreleri ve aktifleşerek miyofibroblast hücre özelliği kazanan Ito hücreleri anahtar rol oynamaktadır. Kupffer hücre ve diğer yangısal hücreler aktive olduğunda, Ito hücreleri de aktive olmaktadır (14, 19, 20). Ito hücrelerinin karaciğere özgü perisitler olduğu, desmin ve α -SMA (+) immün reaksiyon göstermeleri nedeniyle miyojenik kökenli olabileceği düşünülmektedir (2). Enflamatuvar hücre tipleri ve aktive olmuş Kupffer hücrelerinin sekresyonları, enflamatuvar olmayan bir uyarı açığa çıkarmakta ve bu da Ito hücrelerinin aktivasyonunu artırmaktadır (19). Ito hücrelerinin aktive olmasında rol oynayan bir başka faktör ise trombosit kökenli büyüme faktör- β (Platelet derived growth factor- PDGF- β) dir. Aktive olmuş Ito hücreleri göç etmekte ve sayıca çoğalmaktadır. İn vitro şartlarda göç eden Ito hücrelerinin çoğalma yeteneğinin göç etmeyenlere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Alfa-SMA ve PDGF- β (+) olan aktif Ito hücrelerinde göç olayının daha hızlı ve belirgin olduğu, hücre göçünün karaciğerde nekroz sonrası fibrozis gelişiminin başlangıç evresinde ortaya çıktığı bildirilmektedir (21). Desmin ve alfa-SMA artışı olan aktifleşmiş hücreler kasıldığında sinüzoidlerin çapında daralma olmakta, intrahepatik basınç artmakta ve portal hipertansiyon ortaya çıkmaktadır (5), artan kollajen sentezi sonucu fibrozis gelişmektedir (1). Hepatik fibrozis oluşturmak amacıyla deneysel olarak safra kanalının bağlanması 1 hafta sonra portal alan (zon 1) ve v. sentralis çevresinde (zon 3) Ito ve Kupffer hücre sayısının arttığı gözlenmiştir (22). Primer biliyer siroz vakalarında

Kupffer ve Ito hücreleri özellikle periportal alanda artış göstermektedir (14). Karbontetraklorür (CCl_4) ile oluşturulan karaciğer fibrozisinde hücre nekrozu ortaya çıkmakta (11), Ito hücreleri artış göstermektedir (23).

Ito hücrelerinin A vitamini depolaması ile kollajen sentezi arasında zıt bir ilişki bulunmaktadır. Normal şartlarda aktive olmamış Ito hücrelerinde bol miktarda A vitamini bulunmaktadır ve kollajen içermemektedir (8). Aktivasyonda bu hücreler, Tip 3 kollajenin 4-5 kat fazlasıyla Tip 1 kollajen salgılamaktadır. Kültür ortamında A vitamininin doza bağlı olarak kollajen biyosentezini, hücre çoğalmasını baskıladığı tespit edilmiştir (7). Yapılan bir başka çalışmada ise, 3,4,3',4'-tetraklorobifenil toksik maddesi verilmiş sıçanların Ito hücrelerinin miyofibroblastlara benzediği, karaciğer dokusunda nekroz, portal alanlarda orta derecede enflamasyon olduğu görülmüştür. Ito hücrelerindeki A vitamini düzeyinin azaldığı saptanmıştır (24).

Normal karaciğer dokusundaki hücrelerin yaklaşık %7 si Ito hücreleri olup (9), desmin (+) immün reaksiyon gösteren Ito hücrelerine çok az rastlanılmıştır, ancak miyofibroblastik özellik kazanmış Ito hücrelerinde, fibrozis olgularında, desmin (+) immün reaksiyonu sıklıkla ve artmış olarak gözlenmektedir (4). Özellikle prokollajen üreten Ito hücrelerinin % 90'undan fazlasında desmin açığa çıkmaktadır (25). Bu çalışmada, iki farklı dozda A vitamini uygulanan deney ve kontrol karaciğer dokularında, tekrarlanan boyamalar sonucunda desmin (+) immün reaksiyonu izlenmemiştir. Aynı primer antikorun (Antihuman desmin, monoclonal, mouse, D 33, DAKO) kullanılmış olduğu çalışmalarda da desmin (+) immün reaksiyon gösteren Ito hücreleri çok az olarak belirlenmiştir (4). Verilen dozlardaki A vitamininin, 15 günlük sürede Ito hücrelerini aktive etmediği buna bağlı olarak desmin işaretlenmesinin olmadığı düşünülmüştür.

Yüksek doz A vitamininin karaciğer hepatositlerinde bozulmaya, Ito hücrelerinin sayı ve çaplarında artışa neden olduğu bilinmektedir (26). Ito hücrelerinde lipid birikmekte, Kupffer hücreleri aktive olmaktadır. Kupffer hücrelerine de bir miktar lipid girişi olmaktadır (18). Yine sinüzoidler çevresinde fibrozis, sinüzoidlerde genişleme, portal alanlarda enflamasyon ortaya çıkmaktadır (27). Işık mikroskopik çalışmalarda yüksek doz A vitamininin karaciğerde özellikle portal alan çevresindeki hepatositleri etkilediği, hepatositlerin boyanmadığı, Kupffer hücrelerinin artmış olduğu gözlenmiştir (28). Desmin ve vimentin immün boyanması uygulanan bu çalışmada hepatositlerin etkilendiği, sinüzoidlerde genişleme ve kollajen artışının olmadığı tespit edilmiştir. Hücre infiltrasyon alanların olduğu, bu alanları desmin ile (-) immün reaksiyon verdiği ancak vimentin ile (++++)

şiddetinde reaksiyon verdiği görülmüştür.

Vimentin, mezenşimal hücre işaretleyicisi olarak vasküler ve sinüzoidal endotelial hücrelerde (+) immün reaksiyon göstermektedir (10, 29). Vimentin immün reaksiyonun Kupffer hücrelerinde çok belirgin olması nedeniyle primer ve metastatik hepatosellüler karsinomlarda tanı açısından yararlı olmaktadır. İyi veya az farklılaşmış büyük hücreli hepatosellüler karsinomlarda Kupffer hücrelerinde vimentin (+) immün reaksiyonu oldukça artmaktadır. Metastatik karsinomlarda ise çok az artmaktadır veya hiç gözlenmemektedir (17). Vimentin (+) immün reaksiyonu aktive olmuş Ito hücrelerinde de görülmektedir (30).

Bu çalışmada kontrol ve A vitamini verilen sıçan karaciğer dokularında vimentin (+) immün reaksiyonu izlenmiştir. İmmün boyanan hücreler Kupffer hücresi olarak tanımlanmıştır. Deney gruplarında immün reaksiyonun kontrole göre şiddetinin artmış olduğu, Kupffer hücrelerinin aktifleştiği belirgin olarak gözlenmiştir. Sinüzoidlerin endotel hücrelerinde de (+) immün reaksiyonun olduğu, boyanmanın kontrole benzediği izlenmiştir. Portal alandaki boyanma belirgin olarak damar duvarında görülmekteydi.

Sonuç olarak, bu çalışmada uygulanan A vitamini dozlarının 15 gün sürede karaciğerde fibrozis oluşturmadığı, ne portal alanlarda ne de sinüzoid çevresinde kollajen artışı olmadığı, Ito hücrelerinin aktifleşmediği, desmin (-) boyandığı tespit edilmiştir. Vimentin (+) immün reaksiyonun Kupffer hücrelerinde artmış olduğu, Kupffer hücrelerinin aktifleştiği saptanmıştır. Fibrozis oluşmasında Kupffer ve Ito hücrelerinin etkileşiminin önemli olduğu bilgilerinden yola çıkarak, 20 ve 40 mg/kg A vitamini uygulamasının Kupffer hücrelerini aktive ettiği, bir sonraki basamakta ise Ito hücrelerinin aktivasyonunun ortaya çıkabileceği düşünüldü. Ito hücrelerinin aktifleşmesini ortaya çıkaracak A vitamini dozu ve veriliş süresinin belirlenmesi için farklı çalışmaların yapılması ve Ito hücrelerine özgün immün işaretleyicilerin kullanılmasında yarar olacağı, A vitamininin karaciğer fibrozisi oluşturacak dozu konusunda yeni veriler elde edilebileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Ramm Ga, Britton RS, O'Neill R, Blaner WS, Bacon BR. Vitamin A-poor lipocytes; a novel desmin-negative lipocyte subpopulation, which can be activated to myofibroblasts. *Am J Physiol* 1995; 269: 6532-41.
- Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser P, Berg VDK. Class VI intermediate filament protein Nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 520-7.
- Geerts A, Bouwens L, Wisse E. Ultrastructure and function of hepatic fat-storing and pit cells. *J Electron Microscop Tech* 1990; 14: 247-56.
- Ballardini G, Groff P, Giorgi LB, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: Desmin- negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* 1994; 19: 440-6.
- Geerts A, Eliasson C, Niki T, Wielant A, Vaeyens F, Pekny M. Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology* 2001; 33: 177-88.
- Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Sato T, Sugiyama T, Enomoto K, Senoo H. Storage of lipid droplets in and production of extracellular matrix by hepatic stellate cells (vitamin A- storing cells) in Long-Evans Cinnamon- like colored (LEC) rats. *Anat Rec* 2000; 258: 338-48.
- Sato T, Kato R, Tyson CA. Regulation of differentiated phenotype of rat hepatic lipocytes by retinoids in primary culture. *Exp Cell Res* 1995; 217: 72-83.
- Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture. *Gut* 1998; 43: 128-33.
- Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N. Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res* 1997; 38: 645-58.
- Tillmann T, Kamino K, Dasenbrock C, Germann PG, Kohler M. Ito cell tumor: immunohistochemical investigations of a rare lesion in the liver of mice. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 364-9.
- Lukita-Atmadja W. The stellate cells phenotypic transformation in the CCl4-injured liver fibrosis of ICR mice: their desmin immunoreactivity and vitamin A storage. *Kobe J Med Sci* 1993; 39: 15-33.
- Aoki T, Hagiwara H, Fujimoto T. Peculiar distribution of fodrin in fat-storing cells. *Exp Cell Res* 1997; 234: 313-20.
- Tsutsumi M, Takada A, Takase S. Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells. *Hepatology* 1987; 7: 277-84.
- Mathew J, Hines JE, Toole K, Johnson SJ, James OF, Burt AD. Quantitative analysis of macrophages and perisinusoidal cells in primary biliary cirrhosis. *Histopathology* 1994; 25: 65-70.
- Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein-a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1996; 24: 719-30.
- Marugg RA, Gehr P, de Leeuw M. Secondary lysosomes as an integral part of the cytoskeleton: a morphological study in rat Kupffer cells. *J Struct Biol* 1990; 105: 146-53.
- Wu HH, Tao LC, Cramer HM. Vimentin-positive spider-shaped Kupffer cells. A new clue to cytologic diagnosis of primary and metastatic hepatocellular carcinoma by fine-needle aspiration biopsy. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 517-21.
- Lettinga KD, Gutter W, Van Noorden CJ, Schellens JP, Frederiks WM. Early effects of high doses of retinol (vitamin A) on the in situ cellular metabolism in rat liver. *Liver* 1996; 16: 1-11.
- Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Haltner E, Kropf J. Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes). *J Hepatol* 1993; 19: 117-32.
- Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1518-24.
- Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawadw N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760-7.

22. Grinko I, Geerts A, Wisse E. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat-storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. *J Hepatol* 1995; 23: 449-458.
23. Yamane M, Tanaka Y, Maruma F, Sato C. Role of hepatic vitamin A and lipocyte distribution in experimental hepatic fibrosis. *Liver* 1993; 13: 282-7.
24. Azais- Braesco V, Hautekeete ML, Dodeman I, Geerts A. Morphology of liver stellate cells and liver vitamin A content in 3, 4, 3', 4'- tetrachlorobiphenyl- treated rats. *J Hepatol* 1997; 27: 545-53.
25. Herbst H, Frey A, Heinrichs O, Milani S, Bechstein WO, Neuhaus P, Schuppan D. Heterogeneity of liver cells expressing procollagen types 1 and 4 in vivo. *Histochem Cell Biol* 1997; 107: 399-409.
26. Leo MA, Lieber CS. Hypervitaminosis A; A liver lover's lament. *Hepatology* 1988; 8: 412-7.
27. Vishnevskaja EK. The effect of the prodigiosan stimulation of Kupffer cells on the development of perisinusoidal fibrosis in experimental hypervitaminosis A. *Morfologija* 1996; 110: 91-5.
28. Çolakoğlu N, Kükner A. Yüksek doz A vitamininin karaciğer üzerine etkileri. Işık mikroskopik çalışma. *S. Ü. Tıp Fak Derg* 2001; 17: 73-7.
29. Lenzi R, Alpini G, Liu MH, Rand JH, Tavaloni N. Von Willebrand factor antigen is not an accurate marker of rat and guinea pig liver endothelial cells. *Liver* 1990; 10: 372-9.
30. Kiiarov AP. Contact inhibition of desmin expression in rat liver Ito cells in vitro. *Tsitologija* 1998; 40: 876-82.

Geliş Tarihi: 19.09.2001

Yazışma Adresi: Prof. Dr. Aysel Kükner
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD,
23100, ELAZIĞ
akukner@firat.edu.tr