

STUDI IMMUNOHISTOKIMIA SEL-SEL ITO CHOLANGIOHEPATITIS SPONTAN PADA AYAM BROILER

E. HANDHARYANI¹, K. OCHIAI², W. WINARSIH¹, E. HARLINA¹ dan S. ESTUNINGSIH¹

¹Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Laboratory of Comparative Pathology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan

(Diterima dewan redaks 17 Oktober 2001)

ABSTRACT

HANDHARYANI, E. K., OCHIAI, W. WINARSIH, E. HARLINA. and S. ESTUNINGSIH. 2001. Immunohistochemical study of Ito cells of spontaneous cholangiohepatitis in broiler chickens. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(4): 275-279.

The function of Ito cells is expanding from a fat-storing site to a center of extracellular matrix metabolism and mediator production in the liver. Immunohistochemical reactivities of Ito cells were examined in eight livers of broiler chickens affected with spontaneous cholangiohepatitis and six chicken livers with malformation of extrahepatic biliary tracts. The livers in both groups revealed severe diffuse fibrosis. Ito cells expressing HNF35 *muscle actin* and *desmin* actively proliferated in the fibrotic foci of the all livers. The immunoreactivities of Ito cells to antibodies were enhanced compared with those in normal livers. There were no immunohistochemical differences between the Ito cells of two groups. From these findings, it was suggested that Ito cells actively proliferate and show enhanced immunoreactivities in the livers affected with cholangiohepatitis and malformation of extrahepatic biliary tracts.

Key words: Cholangiohepatitis, immunohistochemistry, Ito cell, broiler chicken

ABSTRAK

HANDHARYANI, E. K., OCHIAI, W. WINARSIH, E. HARLINA dan S. ESTUNINGSIH. 2001. Studi immunohistokimia sel-sel Ito cholangiohepatitis spontan pada ayam broiler. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(4): 275-279.

Fungsi sel-sel Ito pada organ hati telah berkembang dari penyimpan lemak menjadi pusat metabolisme matriks ekstraseluler dan produksi mediator. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui reaksi immunohistokimia dari sel-sel Ito yang berasal dari 8 ekor ayam broiler yang mengalami cholangiohepatitis spontan dan 6 ekor ayam broiler dengan malformasi dari buluh empedu ekstrahepatik. Hati pada kedua kelompok ayam menunjukkan fibrosis secara meluas. Peningkatan jumlah sel-sel Ito ditandai dengan ekspresi HNF35 *muscle actin* dan *desmin* ditemukan pada fokal-fokal fibrosis di dalam hati. Reaksi imunologi sel-sel Ito terhadap antibodi-antibodi tersebut lebih nyata di antara dua kelompok yang diamati. Hasil penelitian memberikan gambaran bahwa sel-sel Ito secara aktif bertambah disertai peningkatan reaksi immunohistokimia di dalam hati yang mengalami cholangiohepatitis dan malformasi dari buluh empedu ekstrahepatik.

Kata kunci Cholangiohepatitis, immunohistokimia, sel Ito, ayam broiler

PENDAHULUAN

Kasus cholangiohepatitis, yang secara makroskopik ditandai dengan pembesaran hati, konsistensi menjadi keras dan berwarna pucat telah ditemukan pada ayam broiler di beberapa rumah potong ayam (RANDALL *et al.*, 1983; RANDALL *et al.*, 1986; HUTCHISON dan RIDDELL, 1990). Fibrosis yang meluas, infiltrasi sel-sel heterofil dan limfosit merupakan gambaran yang sangat khas dengan pemeriksaan mikroskopik. ONDERKA *et al.* (1990) menyatakan bahwa infeksi *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) di dalam saluran empedu adalah penyebab kejadian cholecystitis dan hepatitis. Saat ini kasus-kasus yang mirip sering ditemukan di rumah potong ayam di Jepang, dan beberapa di antara kasus tersebut berhubungan dengan penyumbatan

empedu yang disebabkan oleh anomali saluran empedu ekstrahepatik (HANDHARYANI *et al.*, 2001).

Jumlah sel-sel Ito disebut juga sebagai sel penyimpan lemak, sel stellate, sel perisinusoidal, bertambah di daerah periportal dan di sekitar vena sentralis pada hepatitis biliari (GULUBOY A *et al.*, 1997). Kejadian pada manusia dan sejumlah mamalia menunjukkan bahwa ada hubungan antara fibrosis dan pertambahan jumlah sel-sel Ito (HAUTEKEETE dan GEERTS, 1997; KNITTEL *et al.*, 1999). Pada hati yang normal, sel-sel tersebut ditemukan berdasarkan keberadaan gelembung lipid dan ekspresi *α-smooth muscle actin* (HAUTEKEETE dan GEERTS, 1997). Pada tulisan ini disajikan kasus cholangiohepatitis spontan pada broiler, disertai dan tanpa disertai malformasi saluran empedu ekstrahepatik dan difokuskan pada

patomorfologi sel-sel Ito dan patogenesis fibrosis pada hati.

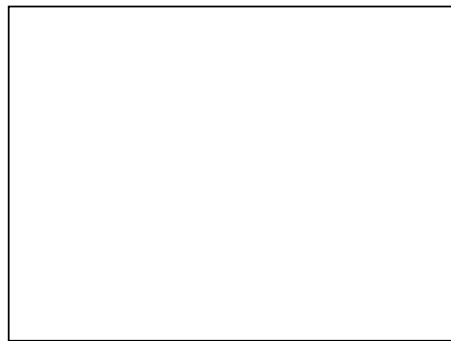
MATERI DAN METODA

Hati dari ayam broiler berumur 56 hari, ditandai pembesaran atau kebengkakan hati, dengan konsistensi mengeras dan keputihan dikumpulkan dari rumah potong ayam di Osaka Jepang. Kantung empedu, saluran empedu, duodenum dan pankreas juga dikaji dalam studi ini. Material difiksasi di dalam larutan Bouin's dan/atau buffer formalin 10%. Untuk pemeriksaan, setiap lobus hati dipotong secara transversal pada tiga bagian (depan, tengah, belakang). Seluruh material secara rutin diproses di dalam parafin, dibuat potongan 3-5 μm (mikrometer), diwamai dengan hematoxilin dan eosin (HE). Potongan transversal juga dilakukan pada kantong empedu, duktus hepatoenterik communis, duktus hepatosistik, duktus sistikoenterik, duodenum dan pankreas. Beberapa potongan jaringan yang sarna diwamai dengan "Masson trichrome", "retikulin silver" dan "Gram". Pewarnaan immunohistokimia dilakukan dengan metoda "streptavidin-biotin complex" (SAB) imunoperoxidase (Nichirei, Tokyo, Japan). Antibodi primer yang digunakan adalah rabbit anti- enterotoksin *C. perfringens* tipe A (pengenceran 1:800 atau 800 x, Biogenesis Ltd, UK), mouse anti-muscle actin/ HHF35 (yang artinya 1 x, Enzo Diagnostic Inc., New York, USA), mouse anti-swine vimentin (dengan 1 x, Dako Corp., Glostrup, Denmark), mouse anti-human desmin (10x, Dako Corp., Carpinteria, USA), rabbit anti-factor VIII-related antigen (5 x, Dako Carpinteria, USA), rabbit anti-cow glial fibrillary acidicprotein/ GFAP (1000 x, Dako Corp., Glostrup, Denmark). Antibodi-antibodi primer tidak diberikan pada kontrol negatif. Potongan jaringan diinkubasi dengan antibodi primer selama 20 jam pada suhu 4°C, direaksikan dengan antibodi sekunder, kemudian diwamai dengan diaminobenzidine dan dikontras dengan hematoxilin (POLAK dan NOORDEN, 1986). Reaksi positif ditunjukkan dengan sel yang berwarna coklat dan evaluasi hasil immunohistokimia dilakukan secara semikuantitatif seperti berikut: -, tidak ada sel yang positif, +, ditemukan sel yang positif dalam jumlah kecil, ++, ditemukan sel yang positif dalam jumlah sedang, +++, ditemukan sel yang positif dalam jumlah besar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pemeriksaan makroskopik, seluruh (empat belas) hati membesar, mengeras, warna menjadi pucat, permukaan tidak rata, dan kadang-kadang disertai dengan bintik-bintik kecil berwarna putih yang tersebar

secara meluas (Gambar 1). Dari pemeriksaan, hati dikelompokkan menjadi dua kelompok; yaitu hati yang membesar disertai dan tanpa malformasi saluran empedu ekstrahepatik. Pada 6 dari 14 hati ditemukan malformasi pada saluran empedu ekstrahepatik. Kantung empedu yang kecil disertai aplasia atau atresia duktus hepatoenterik communis (Gambar 2) ditemukan pada 3 dari 6 hati. Pada 2 hati yang lain ditemukan kantung empedu kecil disertai atresia duktus sistikoenterik. Satu hati yang terakhir menunjukkan tidak ada kantung empedu. Delapan dari 14 hati menunjukkan perubahan hati yang sarna dengan kelompok pertama, dan tidak ditemukan perubahan pada saluran empedu ekstrahepatik. Perubahan patologik juga tidak ditemukan pada duodenum dan pankreas pada seluruh kasus.



Gambar 1. Hati, secara makroskopik membesar, mengeras, permukaan tidak rata, dan berwarna belang. Organ difiksasi dengan buffer formalin 10%. Bar = 10mm

Secara mikroskopik, pada 6 hati kelompok pertama ditemukan fibrosis yang meluas, proliferasi buluh empedu, cholestasis dan kumpulan sel-sel heterofil secara multifokal (Gambar 3). Fokal nekrosis koagulatif dan lisis sel-sel hati ditemukan dalam jumlah yang kecil sampai sedang, dan sel-sel hati di sekitarnya mengalami atrofi.

Gambar 2. Hati dengan malformasi buluh empedu, tidak ditemukan hubungan antara buluh empedu hepatoenterik communis dengan duodenum (panah). Organ difiksasi dengan buffer formalin 10%. Bar = 10 mm

Dengan pewamaan *Masson trichrome*, serabut kolagen ditemukan di sekitar proliferasi buluh empedu dan kelompok sel-sel hati yang atrofi atau mengalami degenerasi. Sebagian besar buluh empedu intrahepatik dan kanalikuli empedu mengalami perluasan (dilatasi) dan berisi empedu. Granuloma multifokal ditemukan pada dua hati. Fokal-fokal granuloma tersebut terutama ditemukan di dalam atau di sekitar buluh empedu intrahepatik; terdiri dari nekrosis sentral yang dikelilingi oleh sel-sel raksasa multinuklear, makrofag, proliferasi jaringan fibrosa dengan infiltrasi sel-sel heterofil dan limfosit.

Gambar 3. Hati yang mengalami fibrosis, sebagian sel-sel hati digantikan oleh jaringan ikat dan proliferasi buluh empedu (anak panah), mengelilingi kelompok sel heterofil. Pewamaan hematoksilin dan eosin. Bar = 35 mm

Kelompok-kelompok bakteri bentuk batang ditemukan di dalam buluh empedu intrahepatik pada 2 hati dengan granuloma dan 1 hati tanpa granuloma. Perubahan pada hati kelompok kedua ditandai dengan granuloma multifokal, cholestasis, proliferasi buluh empedu, fibrosis yang meluas dan sering ditemukan di sekitar daerah portal. Kumpulan sel-sel heterofil dan limfosit sering dijumpai di daerah periportal atau mengelilingi vena sentralis, disertai nekrosis koagulatif dan lisis pada sel-sel hati. Pada kelompok ini, kumpulan bakteri yang sama dengan kelompok pertama juga ditemukan di dalam buluh empedu intrahepatik dan

daerah nekrosis. Sebagian besar bakteri tersebut positif terhadap pewarnaan Gram, dan hasil pewarnaan immunohistokimia menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *C. perfringens* tipe A.

Pemeriksaan mikroskopik terhadap saluran empedu ekstrahepatik yang mengalami malformasi menunjukkan bahwa tunika muskularis mengalami hipertrofi dan fibrosis, disertai hiperplasia berbentuk papila pada epitel. Perubahan tersebut di atas adalah satu hal yang dapat membedakan perubahan pada kelompok pertama dan kedua. Tidak ditemukan perubahan pada duodenum dan pankreas pada seluruh kasus.

Gambaran sel-sel Ito secara immunohistokimia dicantumkan di dalam Tabel 1. Sebagian besar sel-sel tersebut menunjukkan reaksi yang kuat terhadap HHF35 dan desmin (Gambar 4 dan 5). Sel Ito berbentuk pipih atau menyerupai bintang dengan beberapa penjurulan; jumlah bertambah pada daerah periportal dan fibrosis; seperti di sekitar proliferasi buluh empedu dan kelompok sel hati yang mengalami degenerasi. Sel-sel Ito juga menunjukkan reaksi positif terhadap vimentin dan GFAP, tetapi antigen lebih sering ditemukan pada sel-sel yang terletak di daerah perisinusoidal dan bukan di daerah fibrosis. Sel-sel endotel buluh darah positif terhadap factor VIII-related antigen.

Sel Ito adalah salah satu bagian dari sel-sel di dalam sinusoid, mempunyai berbagai peran di dalam patofisiologi hati, terletak di dalam sinusoid hati yang normal pada manusia dan mamalia (WAKE, 1971; HINES *et al.*, 1993; NEUBAUER *et al.*, 1996; TRIM *et al.*, 2000). Kajian pada broiler memberikan hasil bahwa sel-sel tersebut secara aktif bertambah di daerah pembentukan jaringan ikat atau fibrosis pada hati yang secara alami menderita cholangiohepatitis. Pewarnaan immunohistokimia menunjukkan reaksi yang kuat terhadap HHF35 *muscle actin* dan *desmin*. Tidak ada perbedaan secara immunohistokimia pada sel-sel Ito pada hati yang mengalami cholangiohepatitis; dengan dan tanpa malformasi saluran empedu ekstrahepatik.

Tabel 1. Immunohistokimia sel-sel Ito pada hati yang membesar disertai dan tanpa malformasi saluran empedu ekstrahepatik.

Antibodi	Sel-Sel Ito pada hati	
	Malformasi ¹	Tanapa malformasi ²
HHF 35 muscle actin	+++	+++
Vimentin	++	++
Desmin	+++	+++
Factor VIII	-	-
GFAD	++	++

¹Hati disertai malformasi saluran empedu ekstrahepatik, n=6

²Hati tanpa malformasi saluran empedu ekstrahepatik. n 8

- : tidak ditemukan sel yang positif

++ : ditemukan sel-sel Ito yang bereaksi positif dalam jumlah sedikit :

+++ : ditemukan sel-sel Ito yang bereaksi positif dalam jumlah sedang :

+++ : ditemukan sel-sel Ito yang bereaksi positif dalam jumlah banyak.

Gambar 4. Fibrosis hati; sel-sel Ito menunjukkan reaksi positif yang kuat terhadap antibodi HHF35 muscle actin di daerah yang mengalami fibrosis (panah). Metoda SAB dan dikontras dengan hematoksilin. (347 x)

Hal ini menunjukkan bahwa hasil studi pada broiler sarna dengan hasil studi yang telah dilakukan pada manusia dan mamalia (HINES *et al.*, 1993; ENZAN *et al.*, 1994; WONG *et al.*, 1994; GRINKO *et al.*, 1995), dan memberikan dukungan bahwa sel-sel Ito pada jaringan hati pada broiler dapat secara mudah dideteksi menggunakan metode immunohistokimia.

Gambar 5. Fibrosis hati; sel-sel Ito bereaksi positif kuat terhadap anti-desmin (panah). Metoda SAB dan dikontras dengan hematoksilin (347 x)

GFAP adalah filamen intermediate yang pertama ditemukan pada astrosit. Seperti filament intermediate yang lain, GFAP dapat digunakan untuk mengidentifikasi sel-sel glial dan sel-sel non-glial seperti sel-sel kelenjar air liur dan sel-sel pleomorfik adenoma pada manusia (ACHTSTATTER *et al.*, 1986). Anti-GFAP merupakan materi spesifik yang dapat digunakan untuk mendeteksi sel-sel Ito pada hati, untuk membedakan sel-sel ini dengan sel-sel fibroblastik yang

lain di dalam hati (SCHMITT-GRAFF *et al.*, 1994; NEUBAUER *et al.*, 1996; KNITTEL *et al.*, 1999). Hasil studi membuktikan bahwa metoda tersebut dapat diaplikasikan pada broiler. Cholangiohepatitis pada broiler ditandai oleh perluasan buluh empedu intrahepatik, akumulasi empedu pada kanalikuli, degenerasi dari sel-sel hati dan pembentukan jaringan ikat secara luas. Pada sisi yang lain, tidak mudah memutuskan kerusakan sel-sel hati adalah akibat *C. perfringens* atau toksin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut, karena perubahan terjadi secara luas dan bakteri hanya ditemukan dalam jumlah sedikit. Studi yang dilakukan pada broiler memberikan kesimpulan bahwa fibrosis hepatic yang luas pada kasus yang terjadi secara alami berasal dari proliferasi reaktif sel-sel Ito sebagai akibat dari penyumbatan empedu intrahepatik. Pada manusia dan mamalia, cholestasis pada hati akan diikuti oleh pembentukan buluh-buluh empedu baru dan sel-sel Ito yang positif terhadap smooth muscle actin (MAHER and MCGUIRE, 1990; ABDEL-AZIS *et al.*, 1991; HINES *et al.*, 1993; ENZAN *et al.*, 1994; WONG *et al.*, 1995; WISSE *et al.*, 1996).

KESIMPULAN

Studi patomorfologi kasus cholangiohepatitis spontan pada broiler menunjukkan bahwa ada persamaan antara sel-sel Ito yang ditemukan pada hati dengan dan tanpa malformasi saluran empedu ekstrahepatik. Pertambahan jumlah sel-sel tersebut sarna dengan yang pernah ditemukan pada mamalia. Fibrosis hati yang terjadi secara luas pada cholangiohepatitis dihasilkan oleh proliferasi reaktif sel-sel Ito setelah kerusakan sel-sel hati yang disebabkan oleh penyumbatan empedu (cholestasis).

DAFTAR PUSTAKA

- ABOEL AZIZ G. RESCAN P.Y., CLEMENT B., LEBEAU G., RISSEL M., GRIMAUD J.A., CAMPION J.P and GUILLOUZO A. 1991. Cellular sources of matrix protein in experimentally induced cholestatic rat liver. *Journal of Pathology*, 164: 167-174.
- ACHTSTATTER T, MILL R., ANDERSON A., KUHN C., PITZ S., SCHWECHHEIMER K. and FRANKE W.W. 1986. Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cell re-examin_d using monoclonal antibodies, with special emphasis on the co expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas. *Differentiation*, 31: 206-227.
- ENZAN K, HIMENO H., IWAMURA S., SAIBARA T., ONISHI S., YAMAMOTO Y. and HARA H. 1994. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult liver. *Virchowa Archiv*, 424: 249-256.

- GRINKO I., GEERTSA and WISSE E. 1995. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. *Journal of Hepatology*, 23: 449-458.
- GULUBOVA M.V., STOYANOV H.D., JULIANOV AE., VASILEV LV., STOYANOVA I.I. and HADJIPETKOV P.B. 1999. Immunohistochemical detection of collagen type III and IV in relation with transformation of Ito cell in liver sinusoids of patients with reactive biliary hepatitis. *Acta Histochemica*, 10 1 :213-228.
- HANDHARYANI E., OCHIAI K., UMEMURA T. and ITAKURA C. 2001. Extrahepatic bile duct malformation causing intrahepatic cholangiocellular proliferation with fibrosis in broiler chickens. *Avian Pathology*, 30: 63-65.
- HAUTEKEETE M.L. and GEERTS A 1997. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *VirchowArchiv*,430: 195-207.
- HINES J.E., JOHNSON S.J. and BURT AD. 1993. In vivo responses of peri sinusoidal cells (lipocytes) and macrophages to cholestatic liver injury. *American Journal of Pathology*. 142: 511-518.
- HUTCHISON W.S. and RIDDELL C. 1990. A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. *Canadian Veterinary Journal*, 31: 20-25.
- KNITTEL T, KOBOL T D., PISCAGLIA F., SALLE B., NEUBAUER K., MEHDE M., TIRNPL R. and RAMADORI G. 1999. Localization of liver fibroblasts and hepatic stellate cells (HSC) and rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochemistry & Cell Biology*, 112: 387-401.
- MAHER I.I. and MCGUIRE RF. 1990. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 86: 1641-1648.
- NEUBAUER K. KHITTEL T. AURISCH S. FELLNER P. and RAMADORI G. 1996. Glial fibrillary acidic protein: a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *Journal of Hepatology*. 24: 719-730.
- ONDERKA D.K., LANGEVIN C.C. and HANSON J.A 1990. Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligation or inoculation of *Clostridium perfringens*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54: 285-290,
- POLAK Y.M. and NOORDEN S.V. 1986. Immunocytochemistry Modern methods and applications. Wright Bristol. 703 pp.
- RANDALL C.J., STEVEN Hoo WALSBY J.8. and ASHTON W.L.G. 1983. Liver abnormality in broiler carcasses. *The Veterinary Record*, 112:159.
- RANDALL C.J., KIRKPATRICK K.S. and PEARSON D.B. 1986. Liver abnormality in broilers. *The Veterinary Record*, 119: 576.
- SCHMITT GRAFFA., DESMOLIERE A and GABBIANI G. 1994. Heterogenicity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchow Archiv*, 425: 3-24.
- TRIM N., MORGAN S., EVANS M., ISSA ROO FINE D., AFFORD S., WILKINS B. and IREDALE J. 2000. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *American Journal of Pathology*, 156:1235-1243.
- WAKE. 1971. "Stemzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *American Journal of Anatomy*, 132: 429-462.
- WISSE E., BRAET F., LUO D., DE ZANGER R., JANS DOO CRABBE E. and AN VERMOESEN. 1996. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicologic Pathology*, 24:100-111.
- WONG L, YAMAZAKI G., JOHNSON R.J. and FRIEDMAN S.L 1994. Induction of β -platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 94: 1563-1569.