

HANDHARYANI *et al.*: Pengikatan buluh empedu ekstrahepatik pada ayam broiler: kajian ultrastruktur sel ito

## Pengikatan Buluh Empedu Ekstrahepatik pada Ayam Broiler: Kajian Ultrastruktur Sel Ito

EKOWATI HANDHARYANI<sup>1</sup>, K. OCHIAI<sup>2</sup> dan A. WINARTO<sup>3</sup><sup>1</sup>Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia<sup>2</sup>Laboratory of Comparative Pathology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan<sup>3</sup>Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 19 Mei 2004)

### ABSTRACT

HANDHARYANI, E., K. OCHIAI and A. WINARTO. 2004. Extrahepatic bile duct ligation in broiler chickens: ultrastructural study of Ito cell. *JITV* 9(4): 252-257.

The Ito cell (fat-storing cell) is a cell lying in perisinusoidal space of liver. The function of Ito cell is expanding from a site of fat-storing site to a center of extracellular matrix metabolism and mediator production in the liver. This study was performed in order to evaluate the Ito cells in cholestatic condition. The artificial cholestatic was conducted by ligation of extrahepatic bile ducts (bile duct ligation = BDL) in broilers. The results showed that BDL induced bile congestion, fibrosis, proliferation of Ito cells and intrahepatic bile ductules. Immunohistochemistry demonstrated that Ito cells were scattered throughout the fibrotic areas, and larger in size with more extensive immunoreactivity than those in normal livers. Ultrastructural study demonstrated that Ito cells were closely associated with the production of extracellular collagen fibers. Ito cells actively react against hepatocytic injuries, especially in fibrogenesis of cholestatic livers.

**Key words:** Bile duct, ito cell, broiler

### ABSTRAK

HANDHARYANI, E., K. OCHIAI dan A. WINARTO. 2004. Pengikatan buluh empedu ekstrahepatik pada ayam broiler: kajian ultrastruktur sel ito. *JITV* 9(4): 252-257.

Sel Ito atau disebut juga dengan *fat storing cell* adalah salah satu sel yang terletak di daerah perisinusoidal organ hati. Fungsi sel-sel tersebut pada organ hati telah berkembang dari penyimpan lemak menjadi pusat metabolisme matriks ekstraseluler dan produksi mediator. Penelitian ini dilaksanakan sebagai upaya pemahaman sel-sel Ito pada kondisi *cholestasis*. *Cholestasis* diciptakan dengan melakukan operasi pengikatan buluh empedu ekstrahepatik (PBEE), pada broiler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PBEE akan menyebabkan genangan empedu, *fibrosis*, serta proliferasi sel-sel Ito dan buluh empedu intrahepatik. Secara imunohistokimia sel-sel Ito ditemukan pada daerah yang mengalami fibrosis, dan menunjukkan reaksi yang lebih kuat serta mempunyai ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan sel-sel Ito pada hati yang normal. Kajian ultrastruktur atau elektromikroskopik pada broiler menunjukkan bahwa sel-sel tersebut menghasilkan serabut kolagen ekstraseluler. Sel Ito berperan secara aktif setelah terjadi kerusakan hati terutama di dalam proses fibrogenesis pada hati yang mengalami *cholestasis*.

**Kata kunci:** Buluh empedu, sel ito, broiler

### PENDAHULUAN

Kejadian pembesaran hati pernah dilaporkan beberapa kali pada rumah potong ayam (RANDALL *et al.*, 1983; 1986; HUTCHISON dan RIDDEL, 1990). Perubahan secara makroskopik ditandai oleh hati yang membesar, permukaan yang tidak teratur, konsistensi mengeras, dan sering disertai dengan perluasan dan penebalan dinding kantung empedu. Gambaran mikroskopik ditandai oleh fibrosing hepatitis diikuti stasis empedu, proliferasi buluh empedu intrahepatik, infiltrasi heterofil dan kejadian ini sering disertai oleh infeksi bakteri *Clostridium perfringens* (RANDALL *et al.*, 1983; 1986). Kajian lain terhadap pembesaran hati ini membuktikan bahwa perubahan pada kasus tersebut

mempunyai hubungan yang erat dengan malformasi saluran empedu ekstrahepatik (HANDHARYANI *et al.*, 2001).

Pengikatan buluh empedu ekstrahepatik (PBEE) pernah dilakukan pada ayam untuk menciptakan kondisi *cholestasis* secara buatan. Secara mikroskopik perubahan jaringan hati ditandai dengan proliferasi buluh empedu intrahepatik dan fibrosis yang bersifat masif (ONDERKA *et al.*, 1990). Beberapa penelitian dan kajian klinis menyatakan bahwa penyumbatan atau obstruksi buluh empedu ekstrahepatik akan menyebabkan proliferasi buluh empedu intrahepatik (ARONSON *et al.*, 1988; SLOTT *et al.*, 1990; HINES *et al.*, 1993).

Studi lanjut mengenai morfopatologi telah menunjukkan bahwa jumlah sel Ito akan meningkat pada daerah periportal dan di sekitar vena sentralis, serta mempunyai hubungan yang erat dengan fibrosis hepatitis pada manusia dan mamalia (HAUTEKEETE dan GEERTS, 1997; KAWADA, 1997). Pada hati normal, sel-sel tersebut dapat dikenali dengan ciri vakuola lemak pada sitoplasma dan ekspresi *alpha-smooth muscle actin* secara imunohistokimia (HAUTEKEETE dan GEERTS, 1997). Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan studi ultrastruktur terhadap sel-sel Ito setelah pelaksanaan pengikatan buluh empedu ekstrahepatik pada ayam broiler serta untuk mengetahui hubungan sel Ito dengan kejadian fibrogenesis pada unggas.

## MATERI DAN METODE

### Ayam

Dua puluh ekor anak ayam broiler umur satu hari (DOC = *day old chick*) digunakan dalam penelitian ini. Ayam dibagi ke dalam dua kelompok, yaitu kelompok yang dioperasi PBEE dan kelompok kontrol. Seluruh ayam dikandangan secara kelompok dan diberi pakan serta air minum secara *ad libitum*.

### Rancangan penelitian

Kelompok pertama terdiri dari dua belas ekor ayam yang diberi perlakuan operasi pengikatan buluh empedu ekstrahepatik PBEE pada saat berumur tiga minggu. Kelompok kedua sebanyak delapan ekor digunakan sebagai kelompok kontrol. Sebelum dilaksanakan operasi, ayam dibius dengan menggunakan *xylazine* 0,86 ml/kg bobot hidup secara intramuskular kemudian dilanjutkan dengan pemberian ketalar 1,32 ml/kg bobot hidup secara intramuskular. Tiga minggu setelah operasi PBEE dilakukan evaluasi dengan melaksanakan nekropsi terhadap tiga ekor ayam kelompok PBEE dan dua ekor ayam dari kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan secara makroskopik dan dilanjutkan dengan pengambilan material untuk pengamatan mikroskopik. Kegiatan yang sama dilakukan pada lima, tujuh dan sembilan minggu pasca PBEE.

### Histopatologi

Material yang diambil untuk evaluasi histopatologi adalah organ hati, kantung empedu dan buluh empedu ekstrahepatik. Seluruh material difiksasi di dalam larutan *buffer neutral formalin* 10%, secara rutin diproses di dalam paraffin, dibuat potongan 3–5  $\mu$ m, diwarnai dengan hematoksilin dan eosin (HE). Beberapa potongan jaringan yang sama, secara seri

diwarnai dengan “*Masson trichrome*” dan “*reticulin silver*” (KIERNAN, 1990).

### Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia diawali dengan pemotongan jaringan dan kemudian kegiatan dilaksanakan dengan metode “*streptavidin-biotin complex*” (SAB) *imunoperoksidase* (Nichirei, Tokyo, Japan). Antibodi primer yang digunakan adalah *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* (10 x, Dako Corp., Carpinteria, USA), *rabbit anti-factor VIII-related antigen* (5 x, Dako Carpinteria, USA), *rabbit anti-cow glial fibrillary acidic protein/GFAP* (1000 x, Dako Corp., Glostrup, Denmark). Antibodi-antibodi primer tidak diberikan pada kontrol negatif. Potongan jaringan diinkubasi dengan antibodi primer selama 20–22 jam pada suhu 4°C, direaksikan dengan antibodi sekunder, kemudian diwarnai dengan diaminobenzidine dan dikontras dengan hematoksilin menurut prosedur POLAK dan NOORDEN (1986). Reaksi positif ditunjukkan dengan sitoplasma sel yang berwarna coklat dan evaluasi pewarnaan imunohistokimia dilaksanakan secara semikuantitatif seperti berikut: - tidak ditemukan sel yang positif; +, ditemukan sel yang positif dalam jumlah sedikit; ++, ditemukan sel yang positif dalam jumlah sedang; +++, ditemukan sel yang positif dalam jumlah besar.

### Ultrastruktur

Material jaringan untuk pengamatan secara ultrastruktural difiksasi di dalam larutan *glutaraldehyde* 2,50% dalam *buffer phosphate* 0,1 M, disimpan pada suhu 4°C selama 48 jam. Jaringan dicuci dengan *buffer phosphate* 0,1 M, kemudian dimasukkan ke dalam *osmium tetroxide* 1% di dalam larutan *buffer phosphate* (KIERNAN, 1990). Tahapan selanjutnya adalah dehidrasi dengan alkohol bertingkat dan *embedding* dengan Epon (Quetol 812; Nissin EM Co., Tokyo). Dengan menggunakan ultramikrotom dibuat irisan jaringan, diwarnai dengan *uranyl asetat* dan *lead sitrat*, kemudian diamati dengan elektron mikroskop transmisi (JEM-100SX; JEOL, Tokyo).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tiga minggu setelah pelaksanaan PBEE, pemeriksaan makroskopik menunjukkan bahwa hati membesar, permukaan tidak rata atau *irregular*, mempunyai konsistensi yang keras dan berwarna hijau pucat. Kantung empedu dan kedua buluh empedu ekstrahepatik membesar atau mengalami dilatasi dan

dinding menebal serta terjadi penimbunan cairan (*edema*). Lima minggu pasca PBEE hati mempunyai konsistensi yang semakin membesar dan mengeras, pada permukaan dan bidang sayatan terlihat bintik-bintik yang berwarna putih. Perubahan tersebut semakin bertambah pada tujuh dan sembilan minggu setelah PBEE. Pengamatan terhadap organ lain menunjukkan bahwa limpa membengkak dan sumsum tulang berwarna merah. Tidak ditemukan perubahan yang spesifik pada organ lain seperti usus, ginjal, dan jantung pada ayam perlakuan secara makroskopik.

Pengamatan histopatologi menunjukkan bahwa hati mengalami fibrosis yang meluas, proliferasi buluh empedu intrahepatik (Gambar 1), infiltrasi heterofil dan limfosit, cholestasis dan nekrosis sel-sel hati secara multifokal. Tiga minggu setelah PBEE fibrosis dan infiltrasi heterofil sering ditemukan pada daerah portal. disertai dengan perluasan buluh empedu interlobuler. Lima minggu setelah pelaksanaan PBEE lesio semakin meluas. Dengan pewarnaan Masson Trichrome ditemukan pertumbuhan serabut kolagen di sekitar buluh empedu yang berproliferasi dan di sekitar kelompok sel-sel hati. Cholestasis ditandai dengan kehadiran cairan empedu di dalam kanalikuli dan sel-sel hati. Tiga minggu pasca PBEE cholestasis secara terbatas ditemukan pada daerah sentrolobuler, dan perubahan ini semakin meluas ke daerah perilobuler pada lima sampai dengan sembilan minggu pasca PBEE.

### Imunohistokimia

Pengamatan sel Ito dengan metode imunohistokimia menunjukkan bahwa sel-sel tersebut tersebar di seluruh lobulus hati, terletak pada ruang Disse atau disebut juga daerah perisinusoidal. Pada kelompok kontrol, sel Ito bereaksi positif terhadap HHF35 (Gambar 2), dan

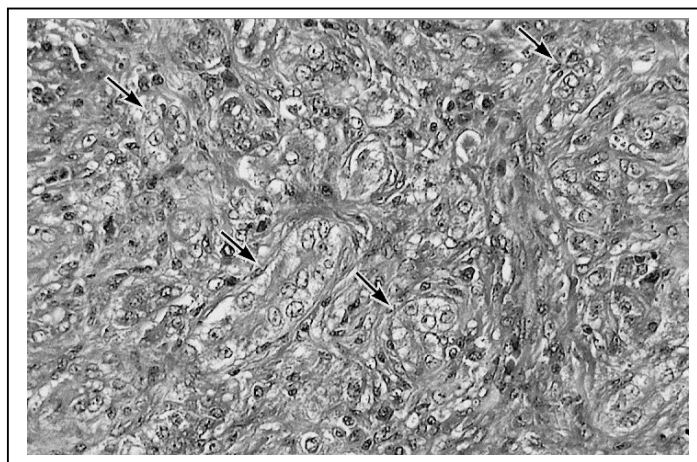
bereaksi positif lemah terhadap vimentin, desmin dan GFAP. Sel Ito mempunyai ukuran yang kecil, berbentuk *spindle* atau bintang dengan satu atau beberapa penjururan dan mempunyai inti yang berbentuk oval atau vesikuler.

Pada hati dengan PBEE, jumlah sel Ito secara umum meningkat, kadang-kadang ditemukan sel yang mempunyai ukuran besar dengan pewarnaan imunohistokimia terhadap HHF35. Sel-sel tersebut berproliferasi di daerah periportal, di daerah fibrosis dan di sekitar sel-sel hati yang mengalami atrofi. Potongan jaringan secara seri menunjukkan bahwa sel-sel ini juga bereaksi positif terhadap vimentin, desmin, dan GFAP (Tabel 1) serta memiliki reaksi yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sel-sel spindle tersebut sangat mirip dengan myofibroblas yang bereaksi positif terhadap HHF35. Perubahan sel-sel hati yang mengalami atrofi dan proliferasi buluh empedu intrahepatik akan membentuk struktur melingkar dan sering disebut dengan penampakan *onion-like* (TUCHWEBER *et al.*, 1996).

**Tabel 1.** Hasil pengamatan sel Ito dengan metode imunohistokimia pada hati ayam

| Antibodi    | Sel ito |      |
|-------------|---------|------|
|             | Kontrol | PBEE |
| HHF35       | +       | +++  |
| Vimentin    | +       | ++   |
| Desmin      | +       | ++   |
| Faktor VIII | -       | -    |
| GFAP        | +       | +++  |

- : tidak ditemukan sel yang positif
- + : ditemukan sel yang positif dalam jumlah sedikit
- ++ : ditemukan sel yang positif dalam jumlah sedang
- +++ : ditemukan sel yang positif dalam jumlah besar



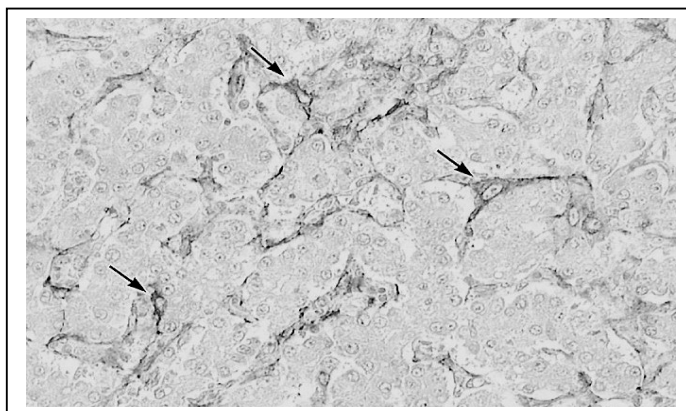
**Gambar 1.** Hati, lima minggu setelah PBEE; hati mengalami fibrosis dan proliferasi buluh empedu intrahepatik ( —————> )  
Pewarnaan HE (488 x)

### Ultrastruktur

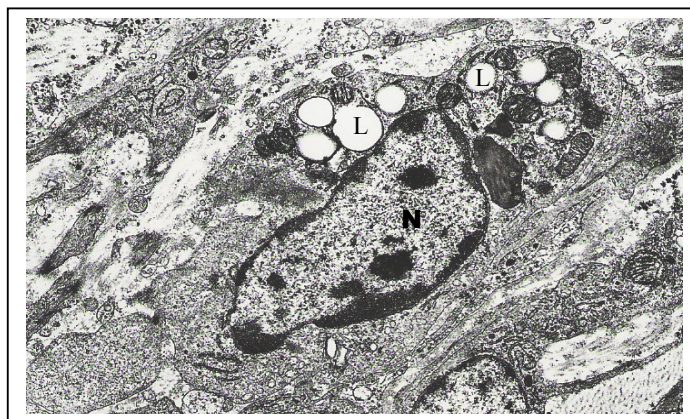
Kajian ultrastruktur terhadap pelaksanaan PBEE memberikan hasil bahwa sel-sel Ito ditemukan di daerah perisinusoidal. Sel-sel tersebut berbentuk lonjong dengan inti oval, di dalam sitoplasma ditemukan atau tanpa vakuola lemak (Gambar 3). *Rough Endoplasmic Reticulum* (RER) ditemukan dalam jumlah cukup banyak di dalam sitoplasma, kondisi ini menunjukkan proses proteogenesis yang sangat aktif. Sejumlah kecil kolagen dapat ditemukan di sekitar sel Ito pada tiga minggu pasca PBEE. Pertambahan jumlah produksi atau proliferasi kolagen ekstraseluler semakin meningkat seiring dengan periode pengikatan atau pelaksanaan PBEE (Gambar 4).

Sel Ito atau disebut juga dengan *fat-storing cell* adalah suatu sel yang terletak di daerah perisinusoidal dan mempunyai beberapa peran di dalam patofisiologi organ hati. Fungsi sel tersebut telah meluas, dari sel yang berfungsi menyimpan depo lemak menjadi sel

yang berperan dalam metabolisme matriks ekstraseluler dan produksi mediator di dalam hati (HINES *et al.*, 1993). Keberadaan sel Ito telah dikaji pada manusia dan kelompok hewan mamalia (WAKE, 1971; HINES *et al.*, 1993; NEUBAUER *et al.*, 1996; TRIM *et al.*, 2000). Kajian sel-sel Ito pada broiler yang dilakukan menunjukkan bahwa sel ini ditemukan menyebar secara luas di seluruh lobulus pada hati normal, yaitu pada daerah perisinusoidal. Dengan metode pewarnaan imunohistokimia ditemukan bahwa sel Ito bereaksi positif terhadap HHF35 *muscle actin*, vimentin, desmin dan GFAP. Hati dengan PBEE akan menyebabkan proliferasi sel-sel Ito yang juga bereaksi positif terhadap HHF35. Kondisi ini sesuai dengan kajian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap keberadaan sel Ito pada manusia maupun mamalia (HINES *et al.*, 1993; GRINKO *et al.*, 1995), jumlah sel Ito yang positif terhadap *alpha-smooth muscle actin* akan bertambah bila hati mengalami obstruksi empedu.

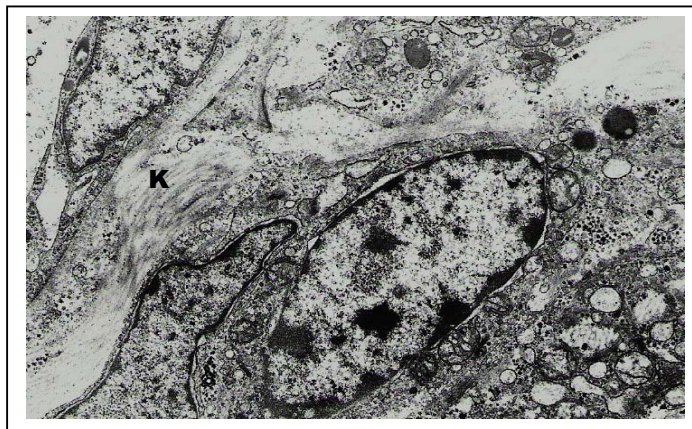


**Gambar 2.** Hati, lima minggu setelah PBEE. Sel-sel Ito ( —> ) menunjukkan reaksi yang kuat terhadap HHF35 *specific muscle actin*. Metode SAB (488 x)



**Gambar 3.** Sel Ito pada hati, inti (N) berbentuk oval dan ditemukan vakuola Lemak (L) pada sitoplasma, tujuh minggu setelah PBEE (5000 x)





**Gambar 4.** Sel Ito dengan pembentukan kolagen (K) ekstraseluler, tujuh minggu setelah PBEE (5000 x)

Hasil pengamatan ultrastruktur terhadap sel Ito pada kondisi obstruksi empedu buatan dengan melakukan PBEE menunjukkan bahwa cholestasis yang terjadi akan mendorong pemunculan serabut kolagen yang baru di sekitar sel Ito. Pengamatan dengan metode imunohistokimia mengindikasikan korelasi positif antara jumlah sel Ito dengan derajat fibrosis. Pada mamalia, sel Ito mempunyai peran yang sangat penting di dalam proses fibrogenesis (MAHER dan MCGUIRE, 1990; FRIEDMAN, 1996). Hasil pengamatan pada kajian ini memberikan petunjuk bahwa sel Ito pada jaringan hati ayam dapat diidentifikasi dengan metode imunohistokimia serta mempunyai peran di dalam proses fibrogenesis.

GFAP adalah filamen *intermediate* yang pertama kali dapat diidentifikasi di dalam astrosit. GFAP dapat ditemukan pada sel-sel glia maupun sel-sel non-glia seperti sel-sel pada kelenjar air liur sel adenoma yang pleomorfik (ACHSTATTER *et al.*, 1986). Pada organ hati, GFAP dapat dipertimbangkan sebagai penanda spesifik untuk sel Ito, sehingga mudah membedakan antara sel-sel Ito dengan sel-sel berbentuk fibroblas pada hati (SCHMITT-GRAFF *et al.*, 1994; NEUBAUER *et al.*, 1996; KNITTEL *et al.*, 1999). Hasil kajian sel Ito pada mamalia dapat diaplikasikan pada broiler.

### KESIMPULAN

Hambatan (obstruksi) aliran empedu dalam waktu yang lama akan menyebabkan proliferasi intensif pada buluh empedu intrahepatik disertai formasi jaringan ikat. Setelah terjadi kerusakan hati, sel-sel Ito berperan secara aktif terutama di dalam proses fibrogenesis pada hati yang mengalami cholestasis. Kajian imunohistokimia dan ultrastruktural terhadap pelaksanaan PBEE pada broiler telah membuktikan bahwa sel-sel Ito mempunyai kemampuan untuk menghasilkan serabut kolagen ekstraseluler.

### DAFTAR PUSTAKA

- ACHSTATTER, T., R. MILL, A. ANDERSON, C. KUHN, S. PITZ, K. SCHECHMEIER and W.W. FRANKE. 1986. Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cell re-examined 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.
- ARONSON D.C., J. DE HAAN, J. JAMES, K.S. BOSCH, A.G. KETEL, J.M. HOUTKOOPER and H.S.A. HEIJMANS. 1988. Quantitative aspects of the parenchymal stroma relationship in experimentally induced cholestasis. *Liver* 8: 116-126.
- FRIEDMAN S.L. 1996. Hepatic stellate cells. *Prog. Liver Dis.* 14: 101-130.
- GRINKO I., A. GEERTS and E. WISSE. 1995. Experimental biliary fibrosis correlates with increased numbers of fat storing and Kupffer cells, and portal endotoxemia. *J. Hepatol.* 23: 449-458.
- HANDHARYANI E., K. OCHIAI, T. UMEMURA and C. ITAKURA. 2001. Extrahepatic bile duct malformation causing intrahepatic cholangiocellular proliferation with fibrosis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 30: 63-65.
- HAUTEKEETE, M.L. and A. GEERTS. 1997. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchow Arch.* 430: 195-207.
- HINES J.E., S.J. JOHNSON and A.D. BURT. 1993. *In vivo* responses of perisinusoidal cells (lipocytes) and macrophages to cholestatic liver injury. *Am. J. Pathol.* 142: 511-518.
- HUTCHISON W.S. and C. RIDDELL. 1990. A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* 31: 20-25.
- KAWADA N. 1997. The hepatic perisinusoidal cell stellate cell. *Histol. Histopathol.* 12: 1069-1080.

- KIERNAN J.A. 1990. *Histological and Histochemical Methods*. Pergamon Press. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford–England. pp. 433.
- KNITTEL T., D. KOBOLT, F. PISCAGLIA, B. SAILE, K. NEUBAUER, M. MEHDE, R. TIRNPL and G. RAMADORI. 1999. Localization of liver fibroblasts and hepatic stellate cells (HSC) and rat livers: distinct roles of (myo)-fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem. Cell Biol.* 112: 387-401.
- MAHER J.J. and R.F. MCGUIRE. 1990. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 86: 1641-1648.
- NEUBAUER K., T. KNITTEL, S. AURISCH, P. FELLMER and G. RAMADORI. 1996. Glial fibrillary acidic protein: a cell type specific marker for Ito cells *in vivo* and *in vitro*. *J. Hepatol.* 24: 719-730.
- ONDERKA D.K., C.C. LANGEVIN and J.A. HANSON. 1990. Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligation or inoculation of *Clostridium perfringens*. *Can. J. Vet. Res.* 54: 285-290.
- POLAK Y.M. and S.V. NOORDEN. 1986. *Immunocytochemistry: Modern methods and applications*. Wright. Bristol. p. 703.
- RANDALL C.J., H. STEVEN, J.B. WALSBY and W.L.G. ASHTON. 1983. Liver abnormality in broiler carcasses. *Vet. Rec.* 112: 159.
- RANDALL C.J., K.S. KIRKPATRICK and D.B. PEARSON. 1986. Liver abnormality in broilers. *Vet. Rec.* 119: 576.
- SLOTT P.A., M.H. LIU and N. TALOVONI. 1990. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 99: 466-477.
- SCHMITT GRAFF, A. DESMOLIERE and G. GABBIANI. 1994. Heterogenicity of myofibroblast phenotype features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchow Arch.* 425: 3-24.
- TRIM N., S. MORGAN, M. EVANS, R. ISSA, D. FINE, S. AFFORD, B. WILKINS and J. IREDALE. 2000. Hepatic stellate cells express low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am. J. Pathol.* 156: 1235-1243.
- TUCHWEBER, A., DESMOULIERE, M. BOUCHATON-PALLAT, L. RUBBIA-BRANDT and G. GABBIANI. 1996. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Invest.* 74: 266-278.
- WAKE. 1971. Sternzellen in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 132: 429-462.