

Marek Bąk¹

Maciej Czerniak¹

Magda Kicińska-Krogulska¹

Aleksandra Michowicz²

Anna Krakowiak¹

TOKSYCZNE USZKODZENIE WĄTROBY — WSPÓŁCZESNY POGLĄD NA ETIOPATOGENEZĘ. CZĘŚĆ I

TOXIC LIVER INJURIES — A CURRENT VIEW ON PATHOGENESIS. PART I

¹ Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

Oddział Toksykologii, Klinika Chorób Zawodowych i Toksykologii

² Uniwersytet Medyczny, Łódź

Oddział Obserwacyjno-Zakaźny, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych

STRESZCZENIE

Toksyczne uszkodzenie wątroby stanowi poważny problem diagnostyczny w praktyce klinicznej lekarza medycyny pracy. Do rozwoju tej jednostki chorobowej dochodzi zarówno w wyniku ostrej, jak i przewlekłej ekspozycji na substancje toksyczne. Efektem końcowym oddziaływania substancji toksycznej na wątrobę może być degeneracja komórki wątrobowej, utrata jej funkcji lub martwica. Zachodzące w przebiegu toksycznego uszkodzenia wątroby zmiany morfologiczne w komórce wątrobowej mogą przebiegać w postaci jednego z czterech fenotypów: uszkodzenia komórki wątrobowej w mechanizmie cholestazy, uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych, którym najczęściej towarzyszy upośledzenie funkcji enzymów metabolizujących ksenobiotyki, uszkodzenia mitochondriów lub uszkodzenia komórki w mechanizmie opóźnionej reakcji immunologicznej. W pierwszej części pracy poglądowej poświęconej mechanizmom toksycznego uszkodzenia wątroby autorzy pracy przedstawili aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów prowadzących do powstawania zmian morfologicznych w hepatocycie w wyniku ekspozycji na ksenobiotyki. Med. Pr. 2011;62(1):47–55

Słowa kluczowe: wątroba, toksyczne uszkodzenie, narażenie na leki, substancje chemiczne, patogeneza

ABSTRACT

Toxic liver injury poses an important health problem in occupational medicine. Toxic response of this organ may arise from acute or chronic exposure to different substances. The final toxicological response to different toxicants may be defined as the degeneration of cells, loss of their function or necrosis. The morphology of toxic drug- or chemical-induced liver injury usually differentiates into one of the following phenotypes: cholestatic injury, hepatocellular injury, often associated with elevated liver enzymes, mitochondrial injuries and delayed immunological injury. In this article, the authors present current knowledge of the pathogenesis of morphological changes in hepatocytes as the result of exposure to xenobiotics. Med Pr 2011;62(1):47–55

Key words: liver, toxic injury, exposure to drugs, chemicals, pathogenesis

Adres autorów: Oddział Toksykologii, Klinika Chorób Zawodowych i Toksykologii,
Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź; e-mail: annakrak@imp.lodz.pl
Nadesłano: 19 października 2010
Zatwierdzono: 6 grudnia 2010

WSTĘP

Toksyczne uszkodzenie wątroby (TUV) stanowi poważny problem diagnostyczny w praktyce klinicznej lekarza medycyny pracy. Do rozwoju tej jednostki chorobowej dochodzi zarówno w wyniku ostrej, jak i przewlekłej ekspozycji na substancje toksyczne. Konsekwencją ekspozycji może być zaburzenie funkcji różnorodnych struktur komórkowych, ponadto zakłócone zostają reakcje zachodzące w cytosolu i zmianie ulegają

właściwości błony komórkowej, co prowadzi do zaburzeń w transporcie przez błonowy.

W początkowym etapie TUV dochodzi do inicjacji uszkodzenia komórki wątroby przez substancję toksyczną. Proces ten może być wywołany poprzez bezpośrednie oddziaływanie substancji toksycznej na komórkę. Podczas kolejnego, tzw. II etapu TUV, ma miejsce postępujące uszkodzenie hepatocytu, niezależne od stężenia toksyny inicjującej. W przebiegu II etapu można wyróżnić następujące reakcje:

- reakcję z udziałem komórek zapalnych i uwalnianych przez nie mediatorów,
- stres oksydacyjny z peroksydacją lipidów,
- reakcje, w których przebiegu dochodzi do uwolnienia lub degradacji enzymów uczestniczących w procesie degradacji ksenobiotyków.

Efektom końcowym oddziaływania substancji toksycznej na wątrobę może być degeneracja komórki wątrobowej, utrata jej funkcji lub martwica.

Zachodzące w przebiegu TUV zmiany morfologiczne w komórce wątrobowej mogą przebiegać w postaci jednego z czterech fenotypów:

- uszkodzenia komórki wątrobowej w mechanizmie cholestatycznym,
- uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych, którym najczęściej towarzyszy upośledzenie funkcji enzymów metabolizujących ksenobiotyki,
- reakcji przebiegających z uszkodzeniem mitochondriów,
- reakcji, w których przebiegu dochodzi do uszkodzenia komórki w mechanizmie opóźnionej reakcji immunologicznej.

CHOLESTATYCZNE USZKODZENIE WĄTROBY

Mechanizm cholestatycznego uszkodzenia wątroby polega na zaburzeniu transportu kwasów żółciowych poprzez hamowanie lub obniżenie progu mechanizmu fizjologicznego ATP-zależnych nośników kwasów żółciowych oraz na zaburzeniu aktywności aktywny. Aktywna powoduje zaburzenia czynności zrębu komórkowego, które prowadzi do zakłócenia transportu żółci wzdłuż kanalików do przewodów żółciowych.

Należy podkreślić, że ciągła produkcja żółci jest niezmiernie ważna dla oczyszczania organizmu z endo- i egzogennych metabolitów. Absorpcja żółci podlegająca krążeniu wątrobowemu dokonywana jest przez Na^+ -zależny system transportujący, komunikujący się z żyłą wrotną. Do systemu transportującego żółć zaliczamy kotransporter taurocholalanu sodu, który należy do grupy polipeptydów transportujących aniony organiczne — są to tzw. pompy eksportu anionów organicznych (organic anion transporting polypeptides — OATP). Poprzez hepatocyt żółć transportowana jest na drodze dyfuzji lub za pomocą wewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych. Kanalikowe układy transportowe u szczytu hepatocyta należą do rodziny ATP-zależnych transporterów, takich jak:

- zewnętrzna pompa eksportu kwasów żółciowych (bile salt export pump — BSEP),

- białko kodowane przez gen oporności wielolekowej (multidrug transporter — MDR2),
- transporter ABCG5/8 (1).

Wzrost stężenia pozakomórkowej bilirubiny indukuje śmierć komórki poprzez zjawisko apoptozy, oddziaływując na zlokalizowane na jej powierzchni receptory śmierci określane jako death receptors dependent fashion (2). Zaburzenie regulacji w transporcie żółci prowadzi więc do wzrostu stężenia kwasów żółciowych, a to z kolei prowadzi do poważnego uszkodzenia hepatocyta.

Zmiany te są mechanizmem spustowym zaburzeń w obrębie wewnątrzkomórkowych układów przekazywanych i odpowiadają za zaburzenia w sekrecji żółci do przewodów żółciowych, zaburzenia proliferacji i przeżycia hepatocyta (3). Substancją egzogenną używaną w badaniach doświadczalnych nad mechanizmami hepatotoksyczności jest czterochlorek węgla (carbon tetrachloride — CCl_4), związek chemiczny powodujący żółtaczkę i włóknienie wątroby.

W wyniku serii doświadczeń wykazano wpływ CCl_4 na transportery kwasów żółciowych OATP₁ i OATP₂ (4). Mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko nie zostały dokładnie poznane, jednak sugeruje się udział mediatorów prozapalnych — takich jak czynnik martwicy nowotworów (tumour necrosis factor alpha — TNF- α) — w mechanizmie uszkodzenia wątroby spowodowanym przez CCl_4 . Spostrzeżenia te potwierdzają wyniki badań podnoszących kwestię efektu hamującego TNF- α i interleukiny 6 (IL-6) w stosunku do sodozależnego kotransportera taurocholalanu w hepatocytach (5–7). Co więcej, mediatory zapalne, takie jak TNF- α i IL-6, powodują zahamowanie aktywności OATP₂ i białka 2 oporności wielolekowej (multidrug resistance protein 2 — MRP2), które są odpowiedzialne za transport bilirubiny i innych jonów organicznych (8).

Istotną rolę w uszkodzeniu wątroby o podłożu cholestatycznym, np. w przebiegu ekspozycji na CCl_4 , przypisuje się białku odpowiedzi wczesnej (early growth response factor-1 — Egr-1). Zauważono bowiem, że u myszy z zablokowanym receptorem Egr-1 (9) dochodzi do zwiększonego napływu neutrofilów. Ponadto obserwuje się zwiększoną aktywność białka zapalnego 2 makrofagów (macrophage inflammatory protein-1 — MIP-2) i cząstki adhezyjnej międzykomórkowej 1 (intracellular adhesion molecule-1 — ICAM-1). Co więcej, kwasy żółciowe same z siebie stymulują ekspresję białka Egr-1 hepatocytów w zwierzęcych modelach żółtaczki. Z tego powodu wzrost stężenia kwasów żółciowych

w żółtaczkach może powodować wtórnie zaburzenia czynności białek transportujących kwasy żółciowe poprzez oddziaływanie różnych cytokin zapalnych (9).

Odrębną kwestią dotyczącą mechanizmów wywołujących cholestatyczne uszkodzenia wątroby są zaburzenia reperfuzji hepatocytu (10). Niedokrwienie wątroby w przebiegu spadku reperfuzji jest częstym następstwem żółtaczki i jest związane z obniżeniem progu mechanizmu fizjologicznego dla kilku białek transportujących kwasy żółciowe, które towarzyszą wzrostowi poziomów TNF- α , IL-1 β i IL-6 oraz spadkowi poziomu czynnika jądrowego wątroby (hepar nuclear transcription factor — HNF-1 α) (11).

W mechanizmie uszkodzenia wątroby w wyniku jej niedokrwienia istotną rolę przypisuje się komórkom Kupffera. Są one zaangażowane w proces niedokrwienności i wykazują działanie ochronne w stosunku do wątroby, uniemożliwiając jej uszkodzenie poprzez podwyższenie progu mechanizmu fizjologicznego w stosunku do degradacji hemu i wydzielania bilirubiny. Spostrzeżenia te zostały potwierdzone w badaniach, w których zmniejszenie ilości szurzych komórek Kupffera powodowało znaczący wzrost poziomów AspAT i AlAT (12).

Bezpośrednia interakcja między związkami toksycznymi a białkami nośnikowymi dla kwasów żółciowych lub genami kodującymi ten proces leży u podstaw pierwotnych uszkodzeń wątroby (13).

Inny mechanizm uszkodzeń wątroby obserwuje się w uszkodzeniach wątroby indukowanych przez estrogeny, co zostało zaobserwowane u kobiet w ciąży lub kobiet stosujących zastępczą terapię hormonalną w okresie postmenopauzalnym (14). Zsyntetyzowany estrogen pochodzący z 17 α -etynyloestradiolu (17 α -ethinylestradiol, EE2) powoduje spadek transportu taurochololanu w wątrobowych kanalikach błonowych (15), co prowadzi do zmniejszenia przepływu żółci (16).

Estrogeny są ligandami dla receptorów znajdujących się w cytosolu i należą do rodziny receptorów dla hormonów steroidowych. Aktywacja tych receptorów powoduje ich przesunięcie się do jądra, gdzie uruchamiają czynniki transkrypcji dla specyficznych genów. W wyniku przyjmowania EE2 może więc dojść do zmian regulacji genów kodujących białka transportowe dla żółci, a tym samym do zaburzeń transportu żółci, które prowadzą do żółciowego uszkodzenia wątroby.

Inny możliwy mechanizm żółtaczki wywołanej przez leki został potwierdzony w uszkodzeniu wątroby wywołanej cyklosporyną A, rifampicyną, i gliben-

klamidem. Te potencjalne substancje hepatotoksyczne wywołują żółtaczkę, bezpośrednio oddziałując na transportery kwasów żółciowych, i wykazują właściwości hamujące transport pompy eksportu kwasów żółciowych dla taurochololanu (17).

Wewnątrzwątrobowe receptory jądrowe a cholestatyczne uszkodzenie wątroby

Wewnątrzwątrobowe receptory jądrowe odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu homeostazy kwasów żółciowych. Przedstawicielami tych receptorów są:

- wewnątrzwątrobowy receptor X dla farnesolu (farnesol X receptor — FXR),
- wątrobowy receptor X (liver X receptor — LXR),
- receptor ciężowy X (pregnane X receptor — PXR),
- receptor dla andosteronu (constitutive androstane receptor — CAR) (18–21).

Naturalnymi ligandami dla ww. receptorów jądrowych, a także hormonów, są sole żółciowe, które regulują transkrypcję genów włączonych w homeostazę kwasów żółciowych. Dokładnie rzecz ujmując, receptor dla transkrypcji jądrowej FXR jest koniecznym składowym komponentem w regulacji homeostazy cholesterolu i jest aktywowany przez kwasy żółciowe (22). Receptor X dla farnesolu jest odpowiedzialny za transkrypcję genów kodujących biosyntezę i transport kwasów żółciowych, a konsekwencją jego aktywacji jest zarówno wzrost wychwytu żółci przez hepatocyt, jak i zwiększone jej wydzielanie do kanalików żółciowych (23,24). Aktywność FXR jest więc bezpośrednio związana z rozwojem żółtaczki (25,26).

Zwiększona synteza kwasów żółciowych a cholestatyczne uszkodzenie wątroby

Kilka mechanizmów może być odpowiedzialnych za morfologię cholestatycznego uszkodzenia wątroby. Przede wszystkim toksyczna cholestaza związana jest z niedrożnością przewodów żółciowych i może prowadzić do zmniejszenia przepływu żółci. W badaniach eksperymentalnych prowadzonych na szczurach zauważono, że cholestaza wywołana przez α -naftylisotiocyanian (alpha-naphthylisothiocyanate — ANIT) związana jest ze wzrostem komórek wyścielających drogi żółciowe (biliary epithelial cells — BEC), prowadząc do niedrożności przewodów żółciowych. Wymienione procesy zależą od czasu terapii i podanej dawki ANIT (27,28).

W innym zwierzęcym modelu cholestazy wywołanej przez kwas lithocholowy (lithocholic acid — LCA) wykazano wzrost stężenia kwasów żółciowych powo-

dujących zarówno niedrożność przewodów żółciowych, jak i zapalenie dróg żółciowych z następczym włóknieniem okołoprzewodowym (29).

Reasumując, konsekwencją oddziaływania substancji toksycznych na komórkę wątrobową mogą być zaburzenia aktywności jądrowych czynników transkrypcyjnych, które prowadzą do zaburzeń procesów wydzielania żółci lub do pozakomórkowej aktywacji reakcji zapalnej poprzez produkcję cytokin prozapalnych.

Przewlekła cholestaza indukuje procesy włóknienia w tkance wątrobowej, prowadząc w fazie schyłkowej do marskości wątroby. Zaburzeniu ulegają wszelkie wewnątrzwątrobowe procesy metaboliczne oraz dochodzi do pojawienia się kwasów żółciowych we krwi na skutek upośledzenia prawidłowej drogi transportu kwasów żółciowych. Aktywacja wątrobowych komórek gwiaździstych (hepatic stellate cells — HSCs) i fibroblastów żyły wrotnej w kierunku miofibroblastów jest wczesnym i głównym mechanizmem w chronicznym cholestatycznym uszkodzeniu wątroby (30–32).

STŁUSZCZENIE WĄTROBY

Przez pojęcie ‘stłuszczenie wątroby’ rozumie się wewnątrzkomórkową kumulację kropli tłuszczu w cytoplazmie. Pierwotne stłuszczenie wątroby występuje m.in. w przebiegu takich chorób metabolicznych, jak otyłość, cukrzyca i hipertrójglicydemia.

Wtórne stłuszczenie wątroby związane jest z ekspozycją na czynniki zewnątrzpochodne (takie jak alkohol, leki, substancje chemiczne), a także w przebiegu choroby Wilsona (uwarunkowane genetycznie zaburzenie metabolizmu miedzi w organizmie) (33).

Stłuszczenie wątroby może także towarzyszyć martwicy, zapaleniu i włóknieniu wątroby — w tych przypadkach nosi nazwę niealkoholowego stłuszczenia wątroby (non-alcoholic steatohepatitis — NASH). W jego przebiegu obserwuje się wczesne zaburzenia metabolizmu w mitochondriach, które ostatecznie mogą prowadzić do martwicy komórki wątrobowej lub jej apoptozy (34). Zarówno do upośledzenia funkcji, jak i struktury mitochondriów może dojść w wyniku rozkojarzenia procesu oksydatywnej fosforylacji i inicjacji śmierci komórki. Na przykład rozkojarzenie łańcucha oddechowego może pochodzić z dysfunkcji oddziaływania enzymów mitochondrialnych, która jest spowodowana mutacją mitochondrialnego DNA (mitochondria DNA — mtDNA) — tego typu zaburzenia wywoływane są w przypadku ekspozycji na związki żela-

za (35). Rozkojarzenie mitochondrialnej oksydatywnej fosforylacji związane z produkcją wolnych rodników tlenowych (reactive oxygen species — ROS) odgrywa istotną rolę w patogenezie stłuszczenia wątroby (36), w NASH i w chorobie Wilsona (37–39).

W patogenezie stłuszczenia wątroby oprócz uszkodzeń procesu oksydatywnej fosforylacji istotną rolę odgrywa także β -oksydacja kwasów tłuszczowych (40). Fizjologicznie kwasy tłuszczowe są metabolizowane przez mitochondrialną i peroksymową β -oksydację. Zakłócenie tych procesów prowadzi do dysfunkcji szeregu enzymów mitochondrialnych, co z kolei powoduje gromadzenie się nie(z)estryfikowanych kwasów tłuszczowych (non-estrified fatty acids — NEFAs) — reakcje tego typu występują m.in. w NASH (41).

Z jednej strony kwasy tłuszczowe wykazują szczególne działanie toksyczne na komórki poprzez mechanizm indukcji apoptozy ścieżką mitochondrialną i lizosomalną (42), a z drugiej — gromadzenie się kwasów tłuszczowych powoduje pewne zaburzenia w metabolizmie lipidów, w których trakcie niezmobilizowane kwasy tłuszczowe są estryfikowane do trójglicerydów. Cholesterol gromadzący się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w przypadku przewlekłego alkoholizmu powoduje spadek aktywności transportera glutationu (glutathione — GSH) i wybiórczo zmniejsza stężenie glutationu w mitochondriach (43).

Kolejnym następstwem β -oksydacji jest stopniowy remodeling prawidłowej wątroby, którego konsekwencją może być jej stłuszczenie. Uszkodzenie procesów β -oksydacji zachodzi na skutek nierozzerwalnego połączenia β -oksydacji i oksydatywnej fosforylacji. Podczas procesu β -oksydacji dochodzi do powstawania zredukowanego NAD^+ — czynnik ten odgrywa kluczową rolę w procesach oddychania mitochondrialnego. Zmniejszenie substratu NAD może pochodzić z zakłócenia procesów oddychania mitochondrialnego i prowadzi do spadku tempa β -oksydacji. Odpowiednio, zakłócenie mitochondrialnej β -oksydacji może wywodzić się z dysfunkcji mitochondrialnych enzymów procesu β -oksydacji lub oddychania tlenowego. Zjawisko to może być powiązane z mutacją mitochondrialnego DNA (mtDNA) lub defektem mechanizmów transportowych białek jądrowych odpowiedzialnych za prawidłową funkcję mitochondriów.

Zauważono, że nasilenie zjawiska apoptozy w NASH hepatocytach związane jest ze zwiększoną aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

i koreluje z ciężkością choroby (44,45). Dokładniejsze badania ujawniły, że kwasy tłuszczowe aktywują apoptozę dwiema ścieżkami. Pierwsza oparta jest na translokacji białka proapoptotycznego Bax do lizosomu, co powoduje jego destabilizację, a w konsekwencji uwolnienie lizosomalnej proteazy cysteiny — katepsyny B (46). W przebiegu drugiej ścieżki dochodzi do aktywacji apoptozy przy udziale mitochondriów poprzez indukcję kinazy JNK (c-Jun N-terminal kinases) i uwolnienie cytochromu c (47).

MECHANIZM AUTOIMMUNOLOGICZNY USZKODZENIA WĄTROBY

Immunologicznie indukowane zapalenie wątroby o opóźnionym czasie wystąpienia objawów klinicznych jest charakterystyczne dla kilku substancji, takich jak: halotan, dihydralazyna, trimetoprim (48,49), karbamazepina (50,51) oraz inhibitor odwrotnej transkryptazy ludzkiego wirusa upośledzenia odporności — Newirapina (52). Intrygujące jest to, że wszystkie wymienione związki mają jedną wspólną cechę — ich bioaktywacja prowadzi do powstania hepatotoksycznych metabolitów, które w połączeniu z białkami wewnątrzkomórkowymi są rozpoznawane jako komórki o właściwościach immunologicznych.

Zapalenie wątroby wywołane przez halotan zwykle rozwija się w 5. dobie po zabiegu anastezjologicznym i towarzyszy ogólnym objawom wskazującym na obecność reakcji zapalnej, takim jak: gorączka, wysypka i eozynofilia (53). Wystąpienie tego schorzenia jest rzadkie (91 przypadków na 35 tys. pacjentów), ale śmiertelność związana z rozwojem niewydolności wątroby jest wysoka (powyżej 50%) (54). Charakterystyczne jest, że u pacjentów, u których wystąpiło zapalenie wątroby spowodowane halotanem, stwierdza się specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko białkom mikrosomalnym. W odpowiedzi na modyfikację przez halotan białka błonowego i tworzenie nowych antygenów powstaje nowy metabolit halotanu — chlorek trifluoroacetylu (trifluoroacetylchloride). Związek ten uczestniczy w tworzeniu trifluoroacetylowanych białek (trifluoroacetylated proteins).

Neoantygeny i antygeny zgodności tkankowej MHC II prezentowane komórkom Kupffera lub komórkom B odgrywają ważną rolę w tworzeniu specyficznych przeciwciał, które mimo aktywacji limfocytów T supresorowych prowadzą do reakcji cytotoxicznych (55,56). Zaskakujące jest, że przeciwciała powstające w zapaleniu wątroby na podłożu immu-

nologicznym wywołanym przez halotan i dihydralazynę są skierowane przeciwko specyficznej izoformie enzymu cytochromalego uczestniczącego w ich metabolizmie. Przeciwciała te wchodzi w reakcję z CYP P-450-zależnymi monooksygenazami, hamując ich aktywność (52). W zapaleniu wątroby wywołanym przez dihydralazynę ujawniono obecność przeciwciał skierowanych przeciwko CYP1A2 (57), podczas gdy halotan powoduje masową produkcję autoprzeciwciał reagujących z CYP2E1 (54).

USZKODZENIE WĄTROBY W MECHANIZMIE WŁÓKNIENIA

Włóknienie wątroby charakteryzuje się rozległym gromadzeniem tkanki łącznej, które prowadzi do zaburzeń architektoniki tego narządu w połączeniu z poważnymi zaburzeniami patofizjologicznymi. Co więcej, w toksycznym włóknieniu wątroby współistnieje proliferacja i naciek zapalny w przewodnikach żółciowych (58). Proces ten ma charakter dynamiczny w zaawansowanym włóknieniu — w jego przebiegu dochodzi do różnicowania się komórek immunologicznych i wzrostu produkcji zewnątrzkomórkowej macierzy (extracellular matrix — ECM).

Remodeling podczas procesów włóknienia prowadzi do bardzo dużego uszkodzenia metabolizmu wątroby, które jest wynikiem nadmiernej produkcji ECM i odkładania się kolagenu I i II w przestrzeniach Dissego. W procesie włóknienia ważną rolę przypisuje się IL-1 i IL-6, czynnikowi wzrostu fibroblastów (fibroblastic growth factors — FGFs), płytkopochodnym czynnikowi wzrostu (platelet growth factors — PDGFs), czynnikowi stymulującemu tworzenie kolonii makrofagowych (macrophage colony stimulating growth factor — M-CSF) oraz czynnikowi wzrostu guzów (tumour growth factor — TGF- β) (59).

Interakcje międzykomórkowe w uszkodzeniu wątroby spowodowanym włóknieniem

Metaboliczna i wydzielnicza funkcja wątroby jest wynikiem burzy sygnałów między komórkami różnego typu. W wątrobie znajduje się ponad 15 rodzajów różnych komórek (60), wśród których hepatocyty stanowią 60% wszystkich komórek wątrobowych. Komórki endotelium zatok (sinusoida endothelial cells — SECs) stanowią pierwotną barierę między krwią a hepatocytami (61). Komórki endotelium są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny i pełnią główną rolę w toksycznym uszkodzeniu wątroby (62,63). Komórki Kupffera

pochodzą z komórek monocytowych, a ich zdolność do produkcji cytokin (takich jak TNF- α) i wolnych rodników tlenowych predysponuje je do głównej roli w inicjowaniu i rozwoju toksycznego uszkodzenia wątroby.

Aktywacja komórek Kupffera i komórek gwiazdzystych nasila włóknienie i odpowiedź zapalną obserwowaną w procesie włóknieniu wątroby (64). Istnieją dowody, które sugerują udział ROS i stresu oksydacyjnego w procesach włóknienia wątroby. Cechą szczególną ROS jest stymulacja wydzielania cytokin przez komórki Kupffera i biosynteza prekursorów zewnątrzkomórkowej macierzy przez komórki gwiazdzyste (65,66). Przyjmuje się, że bez względu na rodzaj mechanizmu spustowego, który powoduje uszkodzenie wątroby, kaskada sygnałów powstających na skutek cytokin uwolnionych z makrofagów i w ten sposób aktywowanych komórek gwiazdzystych, fibroblastów i innych komórek różnicujących się w kierunku miofibroblastów — jest wywołana poprzez ekspresję α -aktyny mięśni gładkich (smooth muscle alpha-actin — SMA) lub ewentualnie poprzez wzrost produkcji zewnątrzkomórkowej macierzy (67).

Ta transformacja w kierunku fenotypu miofibroblastów odgrywa główną rolę w procesie włóknienia wątroby i zależy od aktywności zewnątrzkomórkowych kinaz regulujących (extracellular signal regulated kinase — ERK). Co więcej, aktywowane komórki gwiazdzyste hepatocytów produkują cytokinę TGF- β , która zwiększa migrację komórek zapalnych poprzez ich chemotaksję. Ponadto komórki gwiazdzyste są zdolne do indukcji apoptozy hepatocytów (68).

Rola komórek gwiazdzystych we włóknieniu wątroby wywołanym stresem oksydacyjnym

Wytwarzanie ROS jest bezpośrednio związane z produkcją zewnątrzkomórkowej macierzy na skutek indukcji włóknienia komórek gwiazdzystych przez etanol. Szczególnie CYP2E1 jest indukowany w alkoholizmie i jest potencjalnym generatorem wolnych rodników tlenowych. Anion nadtlenkowy pochodzi z reakcji nadtlenu wodoru i powoduje powstanie wysoko reaktywnego rodnika 1-hydroksylowego, który jest prawdopodobnie głównym źródłem stresu oksydacyjnego wywołującego uszkodzenie wątroby przez etanol.

Najsilniejszym wskaźnikiem rozległego stresu oksydacyjnego w indukowanym przez alkohol uszkodzeniu wątroby jest peroksydacja lipidów. Końcowe produkty peroksydacji lipidów, takie jak 4-hydrokso-2,3-n-onenal (hydroxynonenal — HNE) i malonylodialdehyd

(malonylaldehyde — MDA), wykazują działanie zwiększające syntezę prokolagenu I przez komórki gwiazdzyste (69,70).

W dodatku główny metabolit alkoholu, zwany aldehydem octowym, jest odpowiedzialny za produkcję H_2O_2 przez komórki gwiazdzyste. To pokazuje, że nadtlenek wodoru bezpośrednio indukuje proces transkrypcji prokolagenu $\alpha 1$ (I) (69). Mimo że etanol wykazuje działanie zwiększające ekspresję mRNA $\alpha 1$ prokolagenu (71), aldehyd octowy jest także odpowiedzialny za wzrost $\alpha 2$ kolagenu i ekspresję genu fibronektyny (72). Znaczenie aldehydu octowego jako czynnika indukującego włóknienie wynika z jego właściwości adduktywnych z grupą karboksylową COOH białek prokolagenu w komórkach gwiazdzystych wątroby.

Zwiększenie produkcji zewnątrzkomórkowej macierzy jest istotnym elementem włóknienia wątroby. Aktywacja prekursorów ECM może być wywołana przez stymulację wolnych rodników tlenowych, produkcję cytokin oraz generowanie produktów aldehydowych na skutek działania produktów peroksydacji lipidów. Indukcji TNF- β i aktywacji białka czynnika transkrypcyjnego (activated protein 1 — AP-1) przypisuje się istotną rolę w rozwoju reakcji zapalnej w procesie włóknienia (73).

Reasumując, należy stwierdzić, że u podstaw przyczyn włóknienia wątroby leżą różnorodne mechanizmy, na skutek których funkcja komórek wątrobowych zostaje zmieniona przez toczący się proces zapalny, proliferację komórek o fenotypie miofibroblastów i zwiększenie produkcji zewnątrzkomórkowej macierzy.

PIŚMIENNICTWO

1. Stieger B., O'Neill B., Meier P.J.: ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. *Biochem. J.* 1992;284:67-74
2. Higuchi H., Gores G.J.: Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003;284: G734-G738
3. Xia X., Francis H., Glaser S., Alpini G., LeSage G.: Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J. Gastroenterol.* 2006;12:3553-3563
4. Geier A., Kim S.K., Gerloff T., Dietrich C.G., Lamert F., Karpen S.J. i wsp.: Hepatobiliary organic anion transporters are differentially regulated in acute toxic liver injury induced by carbon tetrachloride. *J. Hepatol.* 2002;37:198-205

5. Green R.M., Whiting J.F., Rosenbluth A.B., Beier D., Gollan J.L.: Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity. *Am. J. Physiol.* 1994;267:G1094–G1100
6. Whiting J.F., Green R.M., Rosenbluth A.B., Gollan J.L.: Tumor necrosis factor-alpha decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. *Hepatology* 1995;22:1273–1278
7. Denson L.A., Auld K.L., Schiek D.S., McClure M.H., Mangelsdorf D.J., Karpen S.J.: Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:8835–8843
8. Zollner G., Fickert P., Zenz R., Fuchsbichler A., Stumptner C., Kenner L. i wsp.: Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001;33:633–646
9. Kim N.D., Moon J.O., Slitt A.L., Copple B.L.: Early growth response factor-1 is critical for cholestatic liver injury. *Toxicol. Sci.* 2006;90:586–595
10. Kudo A., Kashiwagi S., Kajimura M., Yoshimura Y., Uchida K., Arii S. i wsp.: Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 2004;39:1099–1109
11. Tanaka Y., Chen C., Maher J.M., Klaassen C.D.: Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2006;82:258–266
12. Kobayashi T., Hirano K., Yamamoto T., Hasegawa G., Hatakeyama K., Suematsu M. i wsp.: The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver. *Arch. Histol. Cytol.* 2002;65:251–261
13. Yamamoto Y., Moore R., Hess H.A., Guo G.L., Gonzalez F.J., Korach K.S. i wsp.: Estrogen receptor alpha mediates 17alphaethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2006;281:16625–16631
14. Schreiber A.J., Simon F.R.: Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment. *Hepatology* 1983;3:607–813
15. Lee J.M., Trauner M., Soroka C.J., Stieger B., Meier P.J., Boyer J.L.: Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2000;118:163–172
16. Simon F.R., Fortune J., Iwahashi M., Gartung C., Wolkoff A., Sutherland E.: Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am. J. Physiol.* 1996;271:G1043–G1052
17. Byrne J.A., Strautnieks S.S., Mieli-Vergani G., Higgins C.F., Linton K.J., Thompson R.J.: The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002;123:1649–1658
18. Francis G.A., Fayard E., Picard F., Auwerx J.: Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 2003;65:261–311
19. Guo G.L., Lambert G., Negishi M., Ward J.M., Brewer H.B. Jun., Kliewer S.A. i wsp.: Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* 2003;278:45062–45071
20. Karpen S.J.: Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J. Hepatol.* 2002;36:832–850
21. Xie W., Radominska-Pandya A., Shi Y., Simon C.M., Nelson M.C., Ong E.S. i wsp.: An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:3375–3380
22. Forman B.M., Goode E., Chen J., Oro A.E., Bradley D.J., Perlmann T. i wsp.: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995;81:687–693
23. Ananthanarayanan M., Balasubramanian N., Maki-shima M., Mangelsdorf D.J., Suchy F.J.: Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* 2001;276:28857–28865
24. Sinal C.J., Tohkin M., Miyata M., Ward J.M., Lambert G., Gonzalez F.J.: Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731–744
25. Fiorucci S., Clerici C., Antonelli E., Orlandi S., Goodwin B., Sadeghpour B.M. i wsp.: Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;313:604–612
26. Rizzo G., Renga B., Mencarelli A., Pellicciari R., Fiorucci S.: Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005;5:289–303
27. Liu Y., Binz J., Numerick M.J., Dennis S., Luo G., Desai B. i wsp.: Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1678–1687
28. Kossor D.C., Goldstein R.S., Ngo W., DeNicola D.B., Leonard T.B., Dulik D.M. i wsp.: Biliary epithelial cell proliferation following alphanaphthylisothiocyanate (ANIT) treatment: relationship to bile duct obstruction. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995;26:51–62

29. Fickert P., Fuchsbichler A., Marschall H.U., Wagner M., Zollner G., Krause R. i wsp.: Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am. J. Pathol.* 2006;168: 410–422
30. Hines J.E., Johnson S.J., Burt A.D.: *In vivo* responses of macrophages and perisinusoidal cells to cholestatic liver injury. *Am. J. Pathol.* 1993;142:511–518
31. Tang L., Tanaka Y., Marumo F., Sato C.: Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. *Liver* 1994;14:76–82
32. Tuchweber B., Desmouliere A., Bochaton-Piallat M.L., Rubbia-Brandt L., Gabbiani G.: Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab. Invest.* 1996;74:265–278
33. Pessayre D., Berson A., Fromenty B., Mansouri A.: Mitochondria in steatohepatitis. *Semin. Liver. Dis.* 2001; 21:57–69
34. Kim J.S., Qian T., Lemasters J.J.: Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2003;124:494–503
35. Ramm G.A., Ruddell R.G.: Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver. Dis.* 2005;25:433–449
36. Yang Y.L., Li J.P., Xu X.P., Dou K.F., Yue S.Q., Li K.Z.: Protective effects of tumor necrosis factor alpha antibody and ulinastatin on liver ischemic reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.* 2004;10:3161–3164
37. Mansouri A., Gaou I., Fromenty B., Berson A., Lettéron P., Degott C. i wsp.: Premature oxidative aging of hepatic mitochondrial DNA in Wilson's disease. *Gastroenterology* 1997;113:599–605
38. Mansouri A., Gaou I., De Kerguenec C., Amsellem S., Haouzi D., Berson A. i wsp.: An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. *Gastroenterology* 1999;117:181–190
39. Sanyal A.J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Rizzo W.B., Contos M.J., Sterling R.K. i wsp.: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183–1192
40. Fromenty B., Pessayre D.: Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 1995;67:101–154
41. Nehra V., Angulo P., Buchman A.L., Lindor K.D.: Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2001;46: 2347–2352
42. Martins D.L., Cury-Boaventura M.F., Giannocco G., Nunes M.T., Curi R.: Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774). *Clin. Sci. (London)* 2006;111:307–317
43. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N.: Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005;204:263–273
44. Feldstein A.E., Canbay A., Angulo P., Taniai M., Burgart L.J., Lindor K.D. i wsp.: Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125: 437–443
45. Ribeiro P.S., Cortez-Pinto H., Sola S., Castro R.E., Ramalho R.M., Baptista A. i wsp.: Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am. J. Gastroenterol.* 2004;99: 1708–1717
46. Feldstein A.E., Werneburg N.W., Canbay A., Guicciardi M.E., Bronk S.F., Rydzewski R. i wsp.: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185–194
47. Malhi H., Bronk S.F., Werneburg N.W., Gores G.J.: Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006;281:12093–12101
48. Farrell J., Naisbitt D.J., Drummond N.S., Depta J.P., Vilar F.J., Pirmohamed M. i wsp.: Characterization of sulfamethoxazole and sulfamethoxazole metabolite-specific T-cell responses in animals and humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;306:229–237
49. Gruchalla R.S., Sullivan T.J.: Detection of human IgE to sulfamethoxazole by skin testing with sulfamethoxazolyl-poly-l-tyrosine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991;88: 784–792
50. Madden S., Maggs J.L., Park B.K.: Bioactivation of carbamazepine in the rat *in vivo*. Evidence for the formation of reactive arene oxide(s). *Drug Metab. Dispos.* 1996;24:469–479
51. Naisbitt D.J., Britschgi M., Wong G., Farrell J., Depta J.P., Chadwick D.W. i wsp.: Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol. Pharmacol.* 2003;63:732–741
52. Park B.K., Kitteringham N.R., Maggs J.L., Pirmohamed M., Williams D.P.: The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:177–202
53. Pohl L.R.: Drug-induced allergic hepatitis. *Semin. Liver Dis.* 1990;10:305–315

54. Bourdi M., Chen W., Peter R.M., Martin J.L., Buters J.T., Nelson S.D. i wsp.: Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chem. Res. Toxicol.* 1996;9:1159–1166
55. Lohse A.W., Manns M., Dienes H.P., Meyer zum Buschenfelde K.H., Cohen I.R.: Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 1990;11:24–30
56. Lohse A.W., Brunner S., Kyriatsoulis A., Manns M., Meyer zum Buschenfelde K.H.: Autoantibodies in experimental autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* 1992;14:48–53
57. Belloc C., Gauffre A., Andre C., Beaune P.H.: Epitope mapping of human CYP1A2 in dihydralazine-induced autoimmune hepatitis. *Pharmacogenetics* 1997;7:181–186
58. Muller D., Enderle G.J., Low O., Dietze E., Krell H.: Bile ductular proliferation and altered leukotriene elimination in thioacetamide-induced fibrosis of rat liver. *J. Hepatol.* 1996;25:547–553
59. Poli G.: Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 2000;21:49–98
60. Malarkey D.E., Johnson K., Ryan L., Boorman G. Maronpot R.R.: Newinsights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* 2005;33:27–34
61. Smedsrod B.: Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp. Hepatol.* 2004;3(Supl. 1):S22:1–10
62. Dobbs B.R., Rogers G.W., Xing H.Y., Fraser R.: Endotoxin-induced defenestration of the hepatic sinusoidal endothelium: a factor in the pathogenesis of cirrhosis? *Liver* 1994;14:230–233
63. McCuskey R.S.: Sinusoidal endothelial cells as an early target for hepatic toxicants. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2006;34:5–10
64. Mabuchi A., Mullaney I., Sheard P.W., Hessian P.A., Mallard B.L., Tawadrous M.N. i wsp.: Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J. Hepatol.* 2004;40:910–916
65. Pinzani M., Marra F.: Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 2001;21:397–416
66. Thakur V., Pritchard M.T., McMullen M.R., Wang Q., Nagy L.E.: Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production. *J. Leukoc. Biol.* 2006;79:1348–1356
67. Knittel T., Kobold D., Piscaglia F., Saile B., Neubauer K., Mehde M. i wsp.: Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem. Cell Biol.* 1999;112:387–401
68. Gressner A.M., Polzar B., Lahme B., Mannherz H.G.: Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology* 1996;23:571–581
69. Greenwel P., Dominguez-Rosales J.A., Mavi G., Rivas-Estilla A.M., Rojkind M.: Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:109–116
70. Parola M., Pinzani M., Casini A., Albano E., Poli G., Gentilini A. i wsp.: Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1(I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;194:1044–1050
71. Fontana L., Jerez D., Rojas-Valencia L., Solis-Heruzo J.A., Greenwel P., Rojkind M.: Ethanol induces the expression of alpha 1(I) procollagen mRNA in a co-culture system containing a liver stellate cell-line and freshly isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;1362:135–144
72. Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., di Sario A., Saccomanno S., Bendia E., Benedetti A. i wsp.: Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130–1140
73. Leonarduzzi G., Arkan M.C., Basaga H., Chiarpotto E., Sevanian A., Poli G.: Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:1370–1378