

MARCIN KAMIŃSKI, RYSZARD WIADERKIEWICZ

## CZY KOMÓRKI WĄTROBOWE SZACUJĄ RYZYKO USZKODZENIA PRZEZ SUBSTANCJE CHEMICZNE?

### DO LIVER CELLS ESTIMATE THE RISK OF DAMAGE BY CHEMICAL SUBSTANCES?

II Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
Śląska Akademia Medyczna w Katowicach  
40-752 Katowice, ul. Medyków 18  
e-mail: sekhistemb@slam.katowice.pl  
Kierownik: prof. dr hab. M. Kamiński

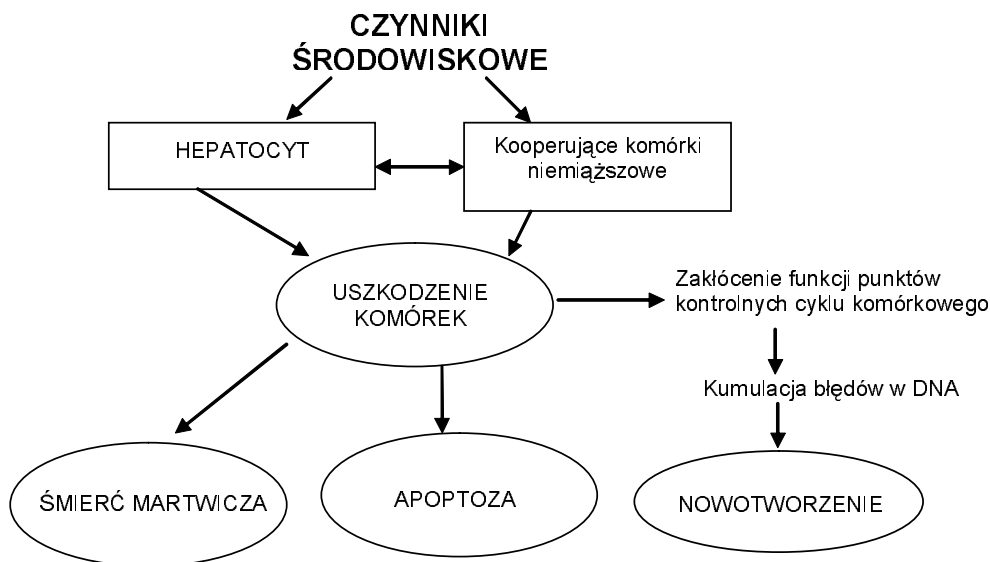
*W artykule dokonano przeglądu możliwych odpowiedzi komórek wątroby na czynniki chemiczne. Omówiono śmierć martwiczą, apoptozę receptorową i mitochondrialną, rolę regulacyjną białek BCL<sub>2</sub>/BAX, białka p53 i innych białek modulujących jego aktywność. Przedstawiono proliferację kontrolowaną opartą na przejściu w pełni zróżnicowanych hepatocytów z fazy spoczynkowej G<sub>0</sub> do fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego.*

### WPROWADZENIE

Wątroba, niezwykle złożony narząd zaopatrzony w dwa źródła unaczynienia – wrotne i czynnościowe, w warunkach prawidłowych wykazuje niską aktywność proliferacyjną [11]. Zaledwie 1 na 10 000 hepatocytów odbywa cykl komórkowy. Reszta komórek mięszowych znajduje się w fazie spoczynkowej G<sub>0</sub>/5/. Ten obraz stabilności i spokoju może być jednak szybko i skutecznie naruszony drogą toksycznego uszkodzenia przez ksenobiotyki, infekcje wirusowe, niedokrwienie i niedotlenienie, doświadczalną lub chirurgiczną hepatektomię [4, 5, 9, 13]. Hepatocyty i współpracujące z nimi komórki nieparenchymalne w określonych sytuacjach środowiskowych i klinicznych podejmują bądź to decyzje proliferacyjne zmierzające do regeneracji narządu, nowotworzenia, bądź to skazujące uszkodzone komórki na śmierć martwiczą lub apoptyczną, czyli genetycznie programowaną [3, 7, 9, 19].

Zlokalizowanie w wątrobie komórek macierzystych, tzw. komórek owalnych, rozmieszczonych w pobliżu przewodników żółciowych *Heringa* w bezpośrednim sąsiedztwie przestrzeni wrotnych, otwarło kolejny problem. Jakie miejsce zajmują wymienione komórki w odpowiedzi wątroby na czynniki środowiskowe, jakie są możliwe szlaki ich różnicowania i czy są one źródłem pierwotnych nowotworów wątroby [4, 10, 14-17]?

Wszystkie wymienione procesy łączą się z biegiem cyklu komórkowego, niewralgicznego momentu w życiu każdej komórki, precyzyjnie kontrolowanego, zapewniającego bądź to odbudowę uszkodzonych komórek, bądź to ich likwidację w sytuacji braku możliwości



Ryc. 1. Uszkodzenie komórek wątroby przez czynniki środowiskowe może prowadzić do ich śmierci lub zapoczątkować proces nowotworzenia.

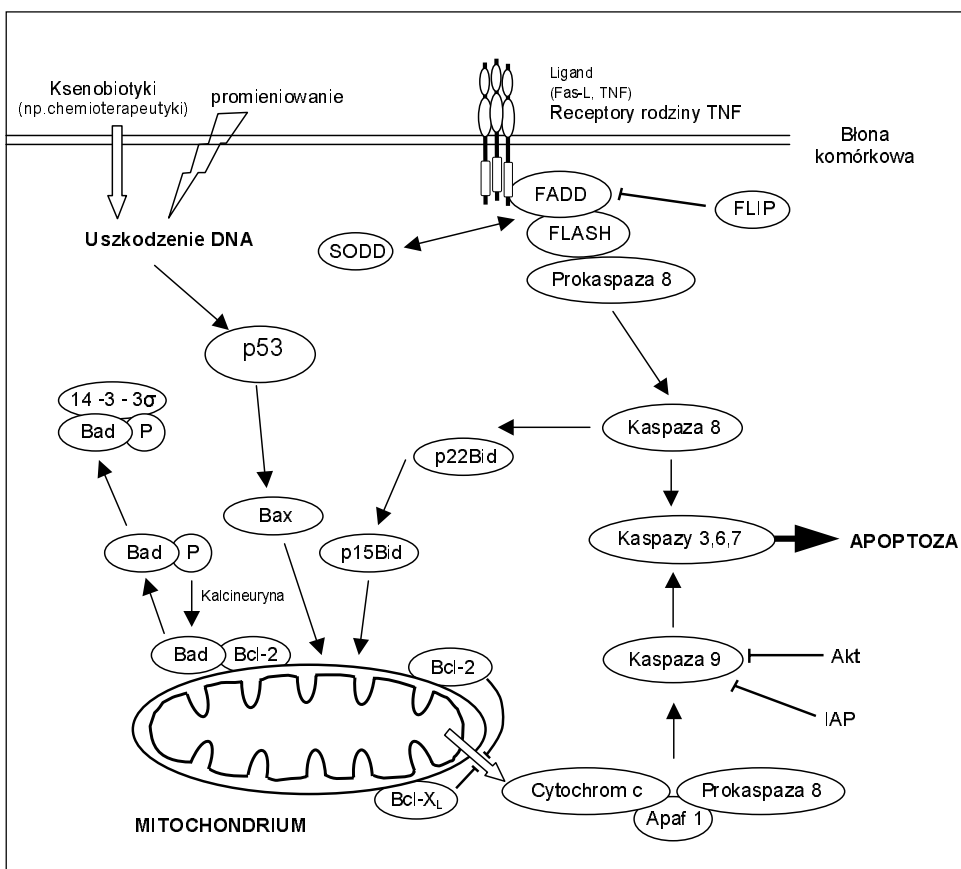
Damage of the liver cells by environmental factors may lead to their death or be the beginning of tumorigenesis process.

naprawy DNA [14]. Cykl ten bezpośrednio sterowany przez cykliny i kinazy zależne od cyklin, wymaga regulacji będącej świadectwem równowagi pomiędzy funkcją protoonkogenów i genów supresorowych produkujących specyficzne czynniki transkrypcyjne, kinazy transdukujące sygnały wewnątrzkomórkowe, systemy naprawy DNA. Część z wymienionych czynników transkrypcyjnych np. p-53 czy c-myc odpowiadają ponadto za uruchomienie procesów apoptozy [1, 11]. Tak więc zarówno odpowiedź proliferacyjna jak i likwidująca komórki w narządzie w odpowiedzi na określone bodźce środowiskowe może być realizowana za pomocą tych samych lub zbliżonych narzędzi. Natomiast przewaga produktów białkowych onkogenów nad produktami genów supresorowych zakłócająca efektywną apoptozę uszkodzonych komórek wiedzie do utrwalenia mutacji w ich genomie i inicjacji nowotworzenia [1, 3]. Zatem proliferacja, umieranie komórek drogą apoptozy oraz nowotworzenie mogą znajdować się na identycznej lub wspólnej ścieżce zdarzeń (Ryc.1).

### DWA OBLICZA ŚMIERCI KOMÓRKI

Śmierć komórki w odpowiedzi na działające na nią czynniki środowiskowe może odbywać się bądź na drodze apoptozy, a więc altruistycznie, w sposób w pełni przez ginącą komórkę kontrolowany lub poprzez martwicę, a więc w sposób brutalny i w niewielkim tylko stopniu kontrolowany [18].

Śmierć martwicza jest wyrazem „bezradności” komórki, której mechanizmy kompensacyjne czy naprawcze nie są w stanie zrównoważyć niszczącego potencjału środowiskowe-



Ryc. 2. Szlak receptorowy i mitochondrialny apoptozy, pomimo, iż indukowane odrębnie, prowadzą w ostatecznym efekcie do aktywacji kaspaz wykonawczych. Oba szlaki powiązane są ze sobą poprzez białko Bid.

Both the receptor and mitochondrial pathways of apoptosis, although separately induced, lead finally to the activation of executory caspases. Both pathways are connected via the Bid protein.

go czynnika uszkodzającego. Rozwijają się uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne mitochondriów, wakuolizacja siateczki śródplazmatycznej, ustaje aktywna wymiana jonów, komórka w wyniku naruszenia ciągłości błony plazmatycznej i przenikania do wnętrza komórki jonów sodu i wody obrzmiewa, a następnie pęka. DNA ulega rozbiciu na fragmenty o nieuporządkowanej masie cząsteczkowej. Wokół martwiczko umierających komórek skupiają się przywoływane przez czynniki chemotaktyczne makrofagi, leukocyty i rozwija się zapalenie. Martwica postępuje gwałtownie, obejmuje duże zespoły komórkowe, stąd jest łatwa do identyfikacji [18].

Śmierć programowana – apoptoza, opisana w 1972 r. przez *Kerr*, *Wyllie* i *Currie* jest przeciwieństwem śmierci martwicznej. Ma wymiar aktywny, wymaga wydatków energetycznych ze strony komórki, uruchomienia syntezy białek, aktywacji enzymów wykonaw-

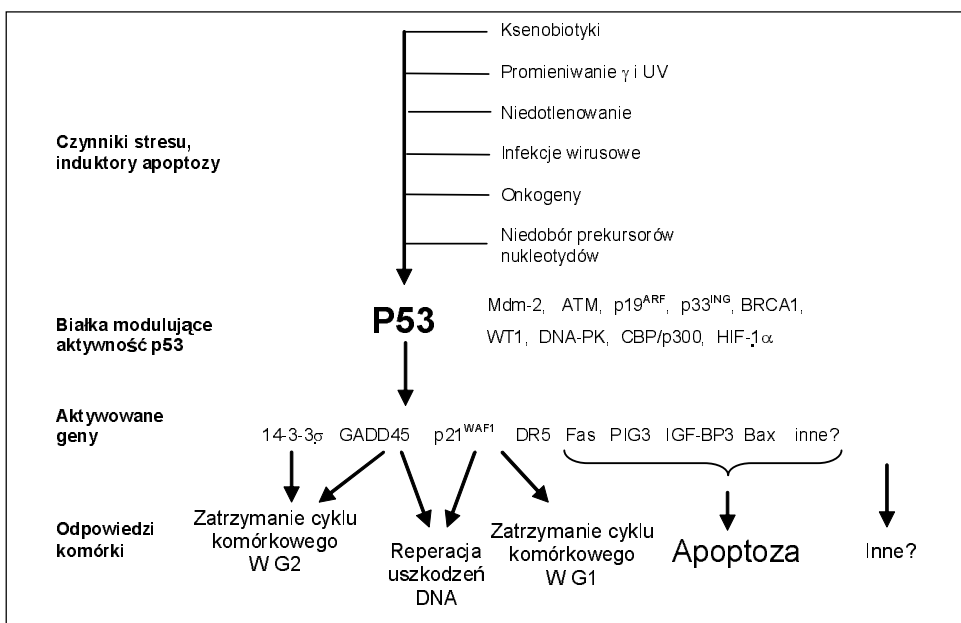
czych i uporządkowanego pocięcia DNA itp. [7, 12]. Jest procesem odgrywającym fundamentalną rolę w całym życiu organizmu począwszy od wczesnych faz życia zarodkowego po starość. Równoważy proliferację, usuwa komórki zbędne, uszkodzone i zmutowane. Zahamowanie sprawnego przebiegu apoptozy wiedzie do nowotworzenia i oporności na leki, a jej przyspieszenie do chorób neurodegeneracyjnych [7, 13]. Komórki wątrobowe wchodzące w apoptozę realizują ją stosunkowo szybko w 186-220 minut. Sam proces jest trudny do wizualizacji za pomocą standardowych metod oceny morfologicznej, bowiem dotyczy zazwyczaj pojedynczych i rozproszonych w narządzie komórek. Rozproszenie więc komórek podlegających apoptozie w wątrobie, a także natychmiastowe ich likwidowanie dzięki receptorom witronektynowym przez sąsiadujące komórki lub komórki żerne *Browicza-Kupffera* stanowiło zasadniczą przyczynę późnego opisanego procesu.

Apoptoza przebiega w kilku powiązanych ze sobą etapach, z których pierwszy, inicjatorowy, tzw. „faza prywatna *Kroemera*”, wydaje się być najbardziej zindywidualizowana [6]. Kolejna faza „wykonawcza” polega na aktywacji kaskady 13 kaspaz (proteaz cysteinowych), kalpainy, Ap24, katepsyn i podjęcia przez nie czynności litycznych w stosunku do składowych jądra i cytoplazmy oraz degradacji DNA. Faza trzecia, końcowa nosi nazwę fazy dezintegracji.

Wyróżniamy kilka podstawowych szlaków aktywacji kaspaz. Szlak zewnętrzny receptorowy jest inicjowany przez przyłączenie odpowiednich ligandów ( $TNF\alpha$ , FASL, TRAIL) do receptorów śmierci będących transbłonowymi glikoproteinami typu II (receptor CD-95/FAS/Apo 1R, TNF-R, receptory TRAIL R1, TRAIL R2, Apo3R) (Ryc. 2). Po połączeniu z ligandem receptory trimeryzują, a zawarte w ich odcinku cytozolemowej domeny śmierci (DD), przywołują białka adaptorowe (TRADD, FADD). Kompleksują się z nimi i poprzez efektorową domenę śmierci (DED) przyłączają i aktywują prokaspazę 8. Powstaje wówczas kompleks DISC. Po tetrameryzacji aktywna, inicjatorowa kaspaza 8 w kompleksie DISC aktywuje z kolei kaskadowo kaspazy wykonawcze 3, 6 i 7. Szlak receptorowy może być efektywnie blokowany przez białko FLIP – hamujące kaspazy inicjatorowe oraz antyapoptyczne endogenne białka IAP, które wpływają znacząco zarówno na kaspazy wykonawcze jak białka adaptorowe. Z innych białek odgrywających rolę regulatorową należy wymienić białka FLASH, SODD, szoku cieplnego – ASP 70, ASP 27, BAG. Kaspazy rozkładają w komórce apoptycznej elementy cyto- i nukleoszkieletu, czynniki transkrypcyjne, białka rodziny BCL<sub>2</sub>/BAX, białka regulujące cykl komórkowy, prekursorzy niektórych cytokin i szereg innych substratów.

Z kolei DNA-aza zależna od kaspaz – DFF40/CAD uruchamiana przez kaspazę 3, rozkłada DNA na fragmenty będące wielokrotnością nukleosomu. W procesie systemowej fragmentacji DNA biorą także udział Nuc 18, DNaza I, DNaza II, endonukleaza G. Szczegółowy opis przebiegu apoptozy realizowanej przez szlak błonowych receptorów z nadrodziny czynnika martwicy nowotworów znajdzie czytelnik w wielu polskich i zagranicznych publikacjach przeglądowych [6, 7, 12, 18, 19].

Drugi ze szlaków apoptozy tzw. szlak wewnętrzny lub mitochondrialny ma w warunkach działania stresu środowiskowego zdecydowanie większe znaczenie i jest kontrolowany przez gen supresji nowotworowej p-53 (ryc. 2). „Faza prywatna *Kroemera*” (inicjatorowa) na szczeblu mitochondriów przebiega dzięki naruszeniu szczelności błazek wewnętrznych na ich styku z błazkami zewnętrznymi [6, 7]. W wyniku naruszenia owej szczelności wyciekają z macierzy mitochondriów takie białka jak: AIF, Smac/Diablo, HTRA<sub>2</sub>, cyto-



Ryc. 3. Odpowiedź komórki na czynniki środowiskowe zależy w znacznym stopniu od aktywacji genów znajdujących się pod kontrolą białka p53 (wg. 19).

The response of the cell to environmental factors depends on the activation of genes controlled by p53 protein (acc.to 19).

chrom c (Apaf-2) oraz jony wapniowe, chlorkowe, wodorowe, prokaspaza 3 i 9. Rozszczelnienie błony wewnętrznej następuje w rezultacie otwarcia kanałów poriny mitochondrialnej oraz wbudowania w ich pobliże białek proapoptycznych BAK, BAX. Wyciekające z mitochondrium składowe działają następująco: AIF aktywuje kaspazę 3, SMAC/DIABLO, HTRA<sub>2</sub> hamują białka IAP, cytochrom c/Apaf 2 po powiązaniu z cytozolowym białkiem Apaf-1 i prokaspazą 9 (-Apaf-3) wytwarza apoptosom. W jego obrębie prokaspaza 9 uwalnia swą blokującą, długołańcuchową prodomenę i staje się aktywną kaspazą inicjatorową, pobudzającą kaskadę kaspaz wykonawczych.

Szlak wewnętrzny apoptozy jest sprzęgany ze szlakiem receptorowym poprzez białko BID z rodziny BCL<sub>2</sub>/BAX [7]. Zawiera ono w swej cząsteczce domenę homologiczną BH<sub>3</sub> i swoją rolę spełnia po proteolitycznym ataku kaspazy 8. Powstający wówczas metabolit p15 BID wbudowuje się w błonę mitochondrialną i sprzyja rozszczelnieniu organellum. Cały szereg innych białek dysponujących wyłącznie domeną BH<sub>3</sub> (np. NOXA, PUMA, BAD, BIM) wiąże się alternatywnie z białkami antyapoptycznymi BCL<sub>2</sub>, BCL<sub>XL</sub>, sprzyjając proapoptycznej aktywności białek BAX i BAK. Białka BCL<sub>2</sub> i BCL<sub>XL</sub>, wzmacniając szczelność błon mitochondrialnych albo poprzez zamykanie kanałów jonowych w błonach mitochondrialnych lub/i regulację megakanalu VDAC, odgrywając tą drogą decydującą rolę w zahamowaniu biegu apoptozy.

Wydaje się, iż szlak mitochondrialny likwidacji komórek odgrywa podstawową rolę w zagrożeniach wynikających z działania ksenobiotyków, leków, niedotlenienia, naruszenia struktury DNA przez promieniowanie jonizujące, onkoproteiny czy deficyt, określo-

nych czynników wzrostowych. Za głównego inicjatora omawianego szlaku uznawane jest białko p53 [7] (Ryc. 3).

Białko p53 uruchamia ponadto transkrypcję genów PIGS odpowiedzialnych za pomnożenie w komórce liczby reaktywnych form tlenowych oraz indukuje syntezę receptorów CD95 i TRAIL-R2/DR5 szlaku zewnątrzkomórkowego. Przypuszczalnie białko p53 może być zastępowane w roli wyzwalającego szlak wewnętrzny apoptozy przez inne białka rodziny p53 – p73 $\alpha$  i  $\beta$  i p51/63.

### NOWOTWORZENIE – PROLIFERACJA NIEKONTROLOWANA

Według *Kanahana* i *Weinberga* kancerogeneza jest procesem wielo-stopniowym i wieloczynnikowym, w którym mutacja genów wywołuje w komórkach szereg zdarzeń:

- a) zaburza proces apoptozy;
- b) wiąże się z brakiem zapotrzebowania na zewnętrzne czynniki wzrostowe;
- c) niewrażliwością na zewnątrzkomórkowe sygnały hamujące proliferację;
- d) wyzwala niepożądaną aktywność replikacyjną [8].

Komórki nowotworowe cechuje tzw. „ucieczka od apoptozy”. Wynika ona z wielu przyczyn, lecz najważniejszą z nich jest mutacja genu supresji nowotworów p53 odgrywającego tak zasadniczą rolę w inicjacji szlaku mitochondrialnego aktywacji kaspaz. Mutacja p53 (stwierdzana w ponad 60% przypadków nowotworów) pociąga za sobą mutacje lub alternatywną ekspresję białek efektorowych procesu apoptozy: PTEN, BAX, BAK i Apaf1, a także białek regulatorowych: kinaz ATM, CHK2, białka MDM2 i p19ARF. Obserwowana jest także nadekspresja BCL2 przyspieszająca onkogenezę u transgenicznych myszy. Z innych przesłanek wiążących się z nowotworzeniem, należy wymienić neoangiogenezę oraz mutacje w DNA mitochondriów [1, 2].

Oslabienie ekspresji białka APAF1 ma miejsce w czerniaku (faza tworzenia przerzutów), a nadekspresja białek IAP i szoku cieplnego (Hsp) hamujących aktywność kaspazy 9 występuje w wielu nowotworach. Zaburzenia szlaku receptorowego śmierci apoptycznej w komórkach nowotworowych są rzadsze niż drogi mitochondrialnej, tym nie mniej niektóre komórki rakowe wykazujące podwyższoną oporność na apoptozę i ujawniają mutacje w receptorach CD95 i TRAIL i innych.

### KONTROLA USZKODZEŃ W GENOMIE

Zarówno środowiskowe jak i wewnętrzne (endogenne) czynniki, naruszają stabilność struktury DNA. Wydaje się, iż drugie z wymienionych, dawniej niedocenione, mogą owe uszkodzenia generować z zaskakująco dużą częstotliwością. Sugeruje się, iż liczba indukowanych w DNA różnego typu uszkodzeń – utrata reszt purynowych, modyfikacje zasad, pęknięcia jednoniciowe – sięga 8000/komórkę w ciągu 1 godziny [20]. Szczególnie niebezpieczne są te z nich, które wyzwalają nadmierną endogenną produkcję wolnych rodników tlenowych, a w tym najbardziej toksycznego anionorodnika hydroksylowego, powstającego z nadtlenu wodoru w reakcji *Fentona*. Znaczącym źródłem uszkodzeń są także błędy w przebiegu replikacji i rekombinacji. Aby zapobiec narastaniu liczby uszkodzeń i przekazywaniu ich pokoleniom potomnym komórki wykształciły skomplikowany ciąg reakcji obronnych precyzyjnie reagujących na uszkodzenia DNA wiodące do zaburzeń

w konformacji chromatyny. Owe zaburzenia śledzą białka czujnikowe (Rad9, Rad1 i Hus1) [20]. Z kolei sygnał alarmowy wyzwała dwa mechanizmy. Pierwszy z nich polega na wyzwoleniu naprawy uszkodzeń, czyli przywróceniu prawidłowej, pierwszorzędowej struktury DNA. Drugi na uaktywnieniu ekspresji grup genów i syntezie nowych białek, które doprowadzają albo do zatrzymania biegu cyklu komórkowego w tzw. punktach kontrolnych i nasilenia procesów naprawy lub lecz wręcz przeciwnie w sytuacji niewydolności energetycznej lub znaczącej skali uszkodzenia skierują komórki na drogę programowanej genetycznie śmierci.

Białka uczestniczące w odpowiedzi na naruszenie struktury DNA podzielono na cztery grupy:

1. Kinazy białkowe typu PI3K-like (PIKL) podobne do kinazy fosfatydyloinozytolu - kinazy *Atm*, *Atr*.

2. Białka tworzące trimery – białka czujnikowe (Rad9, Rad1, Hus1).

3. Kinazy efektorowe serynowo-treoninowe (Chk1, Chk2).

4. Białka adaptorowe (klaspina i Brca1).

Rola kinaz *Atm* i *Atr* polega na fosforylacji białek efektorowych i w zależności od typu uszkodzenia łączy się z:

- a) przywołaniem elementów układów naprawczych DNA do miejsc uszkodzenia,
- b) zahamowaniem transkrypcji,
- c) uaktywnieniem układów śledzących w miejscach kontrolnych cyklu,
- d) uaktywnieniem apoptozy.

Kinazy *Atm* i *Chk2* kontrolują ponadto ekspresję genów odpowiedzialnych za powstanie proapoptycznych białek BAX, BAK, PUMA i NOXA oraz redukcję białek antyapoptycznych BCL<sub>2</sub> i BCLxL i IAP.

Układ nadzorujący genom ulokowany na granicy faz G<sub>1</sub>/S cyklu komórkowego w kluczowej mierze jest reprezentowany przez białko p53. Owo białko oraz histon H2AX jest fosforylowane przez kinazę *Atm*. W konsekwencji chromatyna w miejscu uszkodzenia zmienia swą konformację, sam zaś p53 zostaje uwolniony od ligazy ubikwitynującej Mdm2. W ostatecznym rezultacie p53 tetrameryzuje i staje się aktywnym czynnikiem transkrypcyjnym. W tym procesie istotną rolę spełniają także kinaza *Chk2* oraz białko wiążące 53BP1.

Wśród genów podlegających ekspresji, a odpowiedzialnych za zablokowanie komórek na granicy G<sub>1</sub>/S znajduje się gen kodujący p21 *cip1/waf1* inhibitor kinaz cyklinozależnych – CDK/cyklina E i CDK/cyklina D<sub>1</sub>. W zaistniałych warunkach białko Rb nie jest fosforylowane, nie jest uwalniany kolejny czynnik transkrypcyjny E2F. W konsekwencji nie następuje ekspresja genów swoistych dla fazy S. Z drugiej strony p53 odgrywać może wiodącą rolę w pobudzeniu lub zahamowaniu ekspresji genów kontrolujących apoptozę, o czym uprzednio wspomniano.

W punkcie kontrolnym fazy S układ nadzorujący genom składa się z kinazy *Atm* oraz dwóch kolejnych białek nibryny oraz *Brca1*. Wspomniany układ uczestniczy także w naprawie DNA, bowiem nibryna jest składnikiem kompleksu *Mre11 – Rad50 – Nbs1* realizującego naprawę pęknięć dwuniciowych DNA. Mutacje w obrębie wymienionego kompleksu wiodą do kontynuacji cyklu pomimo obecności uszkodzenia DNA.

W zatrzymaniu komórki w fazie G<sub>2</sub> cyklu uczestniczą zarówno białko p53 jak i kinazy PIKL. P53 hamuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za *Cdc2* i cyklinę B<sub>1</sub>. Znaczenie zasadnicze posiada jednak zahamowanie kompleksu kinazy *Cdc-2* skompleksowanej z cy-

kliną B<sub>1</sub>. Dokonuje się ono poprzez defosforylację tyrozyny 15 w Cdc-2 i utrzymuje się tak długo jak kinazy PIKL otrzymują sygnały o nieciągłości nici DNA. Z kolei kinazy Chk fosforylują fosfatę Cdc25 i ją inaktywują. Fosfataza Cdc25 defosforylująca wspomnianą uprzednio tyrozynę 15 jest efektywnym aktywatorem kompleksu cdc2/B<sub>1</sub>.

Wszelkie wydarzenia zmierzające do zakłócenia mechanizmów uczestniczących w nadzorze nad genomem w poszczególnych punktach kontrolnych cyklu komórkowego sprzyjają niestabilności genetycznej i są decydującym czynnikiem sprawczym w procesie nowotworzenia.

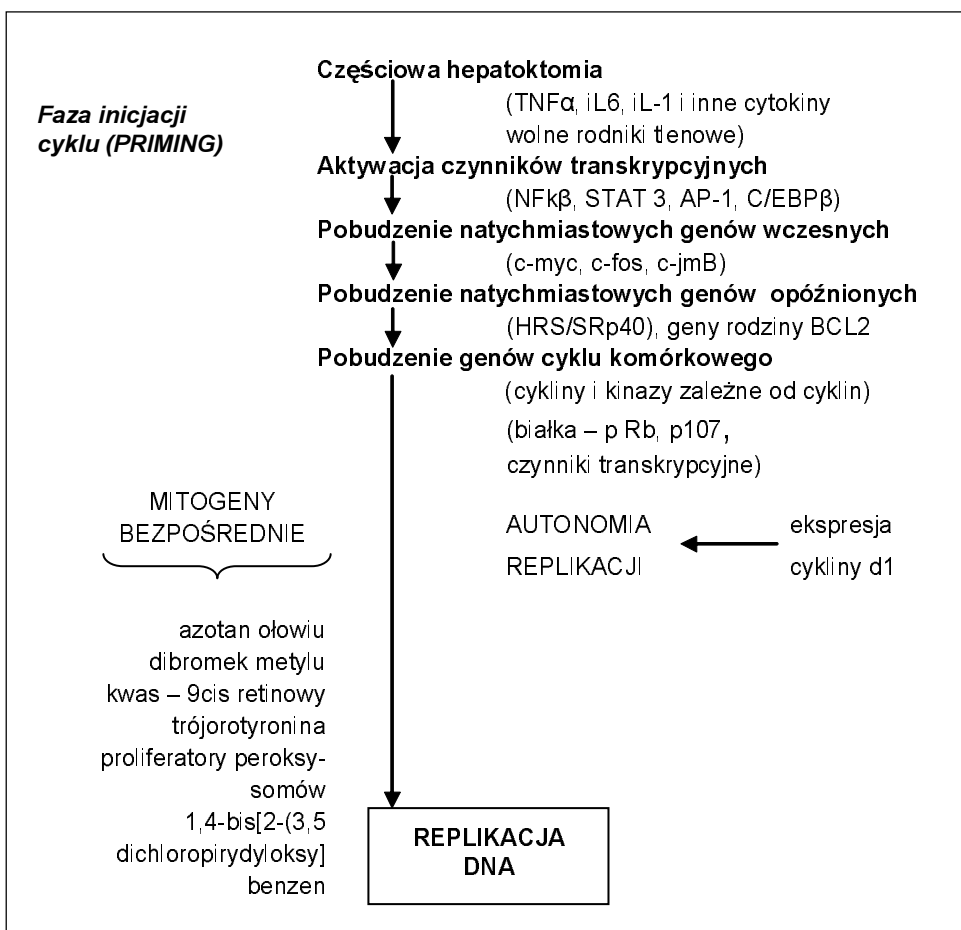
## REGENERACJA – PROLIFERACJA KONTROLOWANA

Obok omówionych dotychczas form odpowiedzi komórek, w tym i hepatocytów na czynniki stresowe, czyli: uruchomienia śmierci martwiczej, długookresowego zablokowania cyklu komórkowego, zaburzenia mitozy, inicjacji apoptozy czy nowotworzenia, możliwe są i inne polegające na wyzwoleniu sterowanej proliferacji (Ryc. 4). Potencjał odbudowy masy wątroby jest wyjątkowy, chociaż w warunkach prawidłowych ma on cechy narządu postmitotycznego. Po utracie natomiast znacznej liczby komórek (hepatektomia doświadczalna, po toksycznym uszkodzeniu przez leki lub substancje chemiczne w warunkach niedotlenienia, po infekcji wirusowej lub usunięciu części mięszu z powodu przrzutów nowotworowych) hepatocyty oraz ściśle współpracujące z nimi komórki niemięszkowe ujawniają wysoki potencjał klonogenny. Po zabiegu częściowej hepatektomii (usunięcie 2/3 masy narządu) po kilkunastu minutach u młodych szczurów ponad 90% początkowo hepatocytów, a następnie pozostałych komórek (cholangiocytów, *Browicza-Kupffera*, komórek Ito, endotelocytów) przechodzi z fazy G<sub>0</sub> do fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego i podlega zazwyczaj jednej lub dwóm cyklom replikacyjnym. Po upływie kolejnych 10-14 dni *quasi* synchronicznych podziałów następuje uzupełnienie utraconego mięszu czynnościowego [5]. Po rozpoczęciu procesu regeneracji spostrzegane są w narządzie kilkunasto komórkowe skupienia hepatocytów w otoczeniu macierzy pozakomórkowej oraz naczyń zatokowych. W 4 dniu komórki Ito penetrują swoimi wypustkami skupienia hepatocytów i uruchamiają syntezę lamininy. Ta prawdopodobnie wyzwala sygnał dla waskularyzacji. Powstają dwukomórkowe blaszki wątrobowe oplatanie siecią naczyń włosowatych zatokowych. Po osiągnięciu 90% wyjściowej masy narządu proliferacja zostaje zahamowana [5].

Udział progenitorowych komórek owalnych (macierzystych) w przebiegu regeneracji po częściowej hepatektomii jest drugorzędny. Uważa się raczej, iż wspomniane komórki uczestniczą w lokalnym uzupełnianiu mięszu uszkodzonego przez leki lub ksenobiotyki, zwłaszcza w sytuacji gdy blokują one aktywność mitotyczną komórek mięszowych w pełni zróżnicowanych.

Zapoczątkowana proliferacja odbywa się z najwyższą intensywnością w strefach I gronek wątrobowych w pewnym dystansie od triad i tetrad wątrobowych. Leżące natomiast w strefach III hepatocyty usytuowane w sąsiedztwie żył centralnych są pod tym względem istotnie opóźniane. Ta strefowo zróżnicowana aktywność proliferacyjna hepatocytów w gronku wynika z odmiennego czasu trwania fazy G<sub>1</sub> w poszczególnych strefach gronek. Jest zdecydowanie krótsza w strefie I i czas jej stopniowo wydłuża się w kierunku strefy II i III. Wydłużenie czasu trwania fazy G<sub>1</sub> w poszczególnych strefach gronek może wynikać z odmiennej aktywności cyklin i kinaz od cyklin zależnych [5].





Ryc. 4. Proliferacja do komórek prowadząca regeneracji mięszu wątroby jest precyzyjnie regulowana poprzez sekwencyjne uruchamianie kolejnych grup genów.  
Proliferation of cells that leads to regeneration of the liver parenchyma is precisely regulated through sequential turning on the respective groups of genes.

Do chwili obecnej nieznane są mechanizmy inicjacji regeneracji wątroby. „Normalne”, prawidłowe hepatocyty nie odpowiadają na sygnały mitogenne. Owa odpowiedź pojawia się po częściowej hepatektomii, po podwiązaniu naczyń wątrobowych i wynikających stąd zaburzeń ciśnienia krwi, po podaniu substancji toksycznych generujących rozległą martwicę narządu np. czterochloru węgla, alkoholu allilowego, niektórych nitrozoamin, pestycydów, rozpuszczalników organicznych itp.

Do potencjalnych czynników uwrażliwiających komórki wątroby na sygnały mitogenne należy aktywator plazminogenu typu urokinazy [5]. Pojawia się on w fazie inicjatorowej regeneracji (pierwsze minuty po hepatektomii) aktywując metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej oraz stymulując dimeryzację HGF. Dopiero forma heterodimerowa HGF wiąże się efektywnie z receptorem cMET/HGF-R i przekazuje sygnał startu proliferacji.

Transkrypcja tkankowego inhibitora metaloproteiny (TIMP-1) przebiega w komórkach nieparenchymalnych wątroby zlokalizowanych w przestrzeniach wrotnych *Dissego* i naczyniach zatokowych. Poziom syntezy owych inhibitorów szybko wzrasta wraz z narastaniem tempa proliferacji. Zatem przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej wyprzedza i towarzyszy proliferacji [5]. Z kolei resynteza i stabilizacja macierzy być może jest odpowiedzialna za zahamowanie pozytywnej odpowiedzi wątroby na mitogeny. Czynniki wzrostowe z rodziny TGF $\beta$  są negatywnymi regulatorami wzrostu hepatocytów, pozytywnie natomiast oddziałują na proliferację komórek *Browicza-Kupffera*, Ito, przyczyniając się do rekonstrukcji naczyń zatokowych otaczających blaszki wątrobowe. Zarówno hepatocyty jak i komórki nieparenchymalne produkują TGF $\beta$  i jego poszczególne izoformy w formie nieaktywnych homodimerów. Ich heterodimeryzacja będąca konsekwencją wpływu plazminogenu pozwala wspomnianym czynnikom wzrostowym na powiązanie się z receptorem TGF $\beta$ -RI i TGF $\beta$ -RII i przekazanie sygnału. Obok TGF $\beta$  wśród czynników hamujących proliferację hepatocytów po resekcji części wątroby wymienia się aktywinę A produkowaną autokrynnie oraz INF $\gamma$  wytwarzany przez aktywne limfocyty wspomagające. Także IL-1 powstającej na terenie komórek *Browicza-Kupffera* i w śródbłonku naczyniowym przypisuje się rolę negatywnego regulatora wzrostu hepatocytów.

Do pozytywnych regulatorów proliferacji hepatocytów należą HGF i TGF $\alpha$ , natomiast VEGF poprzez receptory FLTR-1 i FLTR-2 pobudza wzrost komórek śródbłonkowych. Cytokina TNF $\alpha$ , i to bez towarzyszącego deficytu tkanki wątrobowej wywołanego hepatektomią, wywiera silne działanie proliferacyjne poprzez ekspresje natychmiastowych genów wczesnych oraz wiązanie czynnika transkrypcyjnego AP-1. Pewną rolę w naprawie uszkodzonej wątroby po toksycznym uszkodzeniu odgrywa także IL-6 [5].

HGF nie jest syntetyzowany w hepatocytach. Wytwarzają go natomiast komórki pochodzenia mezenchymalnego zarówno ulokowane w wątrobie (komórki *Browicza-Kupffera*, komórki Ito, komórki śródbłonkowe) jak znajdujące się w nerkach i płucach. Bezpośrednio po doświadczalnej hepatektomii pozapłucne źródła syntezy HGF mają istotne znaczenie dla sprawnego uruchomienia proliferacji hepatocytów. Jest to ważne, z tego powodu, iż omówiony czynnik wzrostowy oprócz silnego działania mitogennego posiada również rolę moto- i morfogenną w stosunku do hepatocytów. HGF działa, jak wspomniano, poprzez receptory c-MET HGF-R znajdujące się na błonach plazmatycznych hepatocytów oraz komórek macierzystych, owalnych.

Patrząc chociażby na miejsca syntezy czynników wzrostowych i cytokin TNF $\alpha$ , HGF, TGF $\beta$ 1, aktywiny, IL6) można wysnuć wniosek, iż pomyślny przebieg regeneracji wymaga ścisłego współdziałania komórek mezenchymalnych, a zwłaszcza *Browicza-Kupffera* oraz proliferujących hepatocytów. Wyłącznie syntezy TGF $\alpha$ , który jest zapewne pierwotnym hepatocytarnym mitogenem, jest modulowane przez komórki mięszone [5].

Ekspresja genu dla powyższego czynnika wzrostowego następuje wcześniej niż samo uruchomienie procesu regeneracji. TGF $\alpha$  łączy się na błonach plazmatycznych komórek mięszone z receptorami czynnika wzrostu śródbłonka EGF-R.

Regeneracja wątroby jest procesem wieloetapowym wymagającym tzw. inicjacji (primingu). Ten odwracalny etap regeneracji ma na celu uczulenie komórek na wyżej omówione czynniki wzrostowe i cytokiny. Polega na wprowadzeniu hepatocytów znajdujących się w fazie spoczynkowej (Go) w pierwszy etap cyklu komórkowego (G1). W zróżnicowanych hepatocytach następuje wówczas aktywacja czynników transkrypcyjnych NF $\kappa$ B

i STAT3 a także AP-1 i C/EBP. Owe czynniki transkrypcyjne wyzwalają z kolei ekspresję ok. 70 natychmiastowych genów wczesnych: C-myc, C-fos, C-junB. Kontynuacja cyklu komórkowego i przejście z fazy G do S wymaga działania TGF $\alpha$  i HGF, które umożliwiają przekroczenie punktu restrykcyjnego fazy G1. W kolejnym etapie, w kilka godzin po hepatektomii dochodzi do ekspresji genów wczesnych opóźnionych – HRS/SRp40, kodujących białka bogate w argininę i serynę (białka SR), odpowiedzialnych za modulowanie alternatywnej obróbki RNA. W 12 godzinie procesu wysoką aktywność wykazują także białka BCL-XL z rodziny BCL2. Drugi szczyt aktywności wymienionego białka ma miejsce w 48 godzinie po hepatektomii. Zbieżność czasowa pomiędzy poziomem aktywności białka z rodziny BCL2 w hepatocytach, a biegiem cyklu komórkowego wydaje się sugerować, iż i one podlegają regulacji zależnej od fazy zaawansowania cyklu komórkowego.

W kolejnej fazie następuje ekspresja genów cyklu komórkowego odpowiedzialnych za syntezę odpowiednich cyklin i zależnych od nich kinaz (cdks). Maksymalna ekspresja cykliny D1 ma miejsce w tym przedziale cyklu komórkowego, w którym proliferujące hepatocyty nabierają autonomii replikacyjnej i są już niezależne od czynników wzrostowych. Ekspresja cykliny A i B towarzyszy replikacji DNA i mitozie [5].

M. Kamiński, R. Wiaderkiewicz

#### DO LIVER CELLS ESTIMATE THE RISK OF DAMAGE BY CHEMICAL SUBSTANCES?

##### Summary

The article reviews the possible responses of liver cells to chemical insult. Both the necrosis and different ways of apoptotic death are considered. The regulatory role of BCL<sub>2</sub>/BAX proteins, p53 protein as well as other proteins modulating its activity is also described.

The controlled proliferation is presented which base on transition of fully differentiated hepatocytes from the resting G<sub>0</sub> phase to G<sub>1</sub> phase of cell cycle. It is triggered by the loss of organ mass after extensive necrosis induced by xenobiotics. In this context the interrelations between the parenchymal cells (hepatocytes) and nonparenchymal cells, intercellular matrix, released growth factors are discussed. Tumorigenesis is also mentioned with special emphasis on the cell cycle control points and „run-away” from apoptosis of some cells despite the serious mistakes present in their DNA.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Bartnik E., Lorenc A.: Nowotwory a geny. Post. Biol. Kom. 2000, Suppl.15, 27, 5-8.
2. Baysal B. i wsp.: Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. Science 2000, 287, 848-851.
3. Cavalli R., Liang B.G.: Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved? Mut. Res. 1998, 398, 19-26.
4. Czekaj P., Wiaderkiewicz R., Kamiński M.: Niezróżnicowane komórki wątroby. Med. Sci. Rev. 2004, 4, 19-27.
5. Fausto N.: Liver regeneration. J. Hepathol. 2000 suppl.1, 1, 19-31.
6. Gądzka I.: Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. Post. Bioch. 2000, 46, 1, 1-14.
7. Grzelakowska-Sztabert B.: Apoptoza i nowotwory. Post. Biol. Kom. 2000, Suppl. 15, 27, 9-43.
8. Hanahan D., Weinberg R. A.: The hallmarks of cancer. Cell 1999, 100, 57-60.

9. *Kamiński M., Wiaderkiewicz R.*: Tumors induction by environmental factors. *Pol. J. Environ. Studies.* 2003, Suppl. I, 121, 17-22.
10. *Marszałek T.*: Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Cz. I, II. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, 135-179.
11. *Michalopoulos G., De Frances M.*: Liver regeneration. *Science* 1997, 276, 60-66.
12. *Mróz P., Młynarczyk I.*: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post. Biol. Kom.* 2003, 30, 113-128.
13. *Robertson J.A., Orrenius S.*: Molecular mechanism of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000, 30, 609-613.
14. *Roskams T., De Vos R., Van Eyken P.*: Hepatic OV06 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J. Hepatol.* 1998, 29, 455-463.
15. *Sell S.*: Is there a liver stem cell? *Cancer Res.* 1990, 50, 3811-3815.
16. *Sell S., Pierce B.*: Biology of disease. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab. Invest.* 1994, 70, 6-22.
17. *Sell S.*: Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocyte following necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem. Cell.* 1997, 15, 378-385.
18. *Sulejczyk D.*: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post. Biol. Kom.* 2000, 27, 527-539.
19. *Szala S.*: Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000, 50, 111-121.
20. *Szumiel I.*: Punkty kontrolne w cyklu komórkowym. *Post. Biol. Kom.* 2002, Suppl. 19, 29, 3-4.

Otrzymano: 2004.07.28