

Apoptoza w wybranych chorobach wątroby – implikacje kliniczne i terapeutyczne

Apoptosis in selected liver diseases – clinical and therapeutic implications

Sylwia Serafińska, Krzysztof Simon

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych AM, Wrocław

Summary: The liver is continuously exposed to a large antigenic load that includes pathogens, toxins, tumor cells and dietary antigens. Amongst the hepatitis viruses, only hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) cause chronic hepatitis, which can progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Of the different antiviral defence systems employed by tissue, apoptosis significantly contributes to the prevention of viral replication, dissemination, and persistence. In addition apoptotic processes play a significant role both in liver damage and in the course of others liver diseases (alcoholic hepatitis, hepatocarcinoma, cholangiocarcinoma, cholestatic disease, Wilson's disease, autoimmune diseases). The assessment of the severity of liver disease, as well as monitoring of patients with chronic liver disease, remains a major challenge in clinical hepatology practice. Therefore the development of new therapeutic strategies by protecting hepatocytes from apoptosis or by the induction of apoptosis in stellate cells remains very important research for the near future.

Słowa kluczowe: apoptoza • choroby wątroby

Key words: apoptosis • liver diseases

Adres do korespondencji: Sylwia Serafińska Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych AM, ul. Koszarowa 5, 51-149 Wrocław, Polska, e-mail: sylwiaseraf@poczta.onet.pl

Apoptoza – definicje i mechanizmy

Wątroba jest narządem o olbrzymich zdolnościach adaptacyjno-metabolicznych i regeneracyjnych. Nie byłoby to możliwe, gdyby nie zachodziły w niej liczne, złożone, wzajemnie zależne procesy warunkujące jednocześnie proliferację komórek (odbudowę i regenerację tkanek) oraz usuwanie elementów zbędnych i zużytych oraz uszkodzonych (śmierć komórkowa, tkankowa). Wiele czynników, na które wątroba jest stale ekspozycja, nie powoduje żadnego jej uszkodzenia. Istnieje jednak wiele stanów chorobowych, w których patologiczne uszkodzenie wątroby jest nieuniknione i nieodwracalne. Na ostateczne funkcjonowanie wątroby i stopień jej wydolności istotny wpływ ma to, który z procesów przeważa – planowa regeneracja i proliferacja komórek czy masowa martwica lub apoptoza a w konsekwencji czynnościowa niewydolność narządu.

Procesy prowadzące śmierć komórkowej: martwica (nekroza) i programowana śmierć komórki (apoptoza – *apo'pto'sis* – grek. „opadanie liści”) różnią się istotnie zarówno pod względem morfologicznym, jak i biochemicznym. Zwykle przebiegają niezależnie od siebie, choć *in vivo* obserwu-

je się czasami procesy łączące cechy obu typów śmierci komórkowej, zachodzące równocześnie nawet w tych samych komórkach [1].

Martwica komórkowa jest następstwem uszkodzeń mechanicznych i metabolicznych błony komórkowej i błonowych kanałów jonowych. Zaburzenia transportu jonów sodu, potasu i wapnia oraz upośledzenie syntezy ATP powoduje utratę przez błony komórkowe ich właściwości i utratę kontroli procesów odbywających się wewnątrz cytoplazmy. Skutkuje to obrzękiem mitochondriów i pozostałych organelli oraz aktywacją enzymów degradujących struktury komórkowe. Następuje liza komórki i uwolnienia do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jej elementów, jednoczesna aktywacja komórek układu odpornościowego zapoczątkowuje reakcję zapalną o różnym nasileniu [2].

W przebiegu śmierci apoptotycznej komórki, procesu silnie energochłonnego, zależnego od ATP – nie dochodzi do bezpośredniej indukcji odpowiedzi immunologicznej a tym samym reakcji zapalnej. Przebieg apoptozy charakteryzuje kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra, tworzenie pęcherzyków apoptotycznych (pączkowanie błony ko-



mórkowej) oraz stopniowe kurczenie się komórki. Powstałe struktury są fagocytowane przez makrofagi i komórki sąsiadujące. Przebieg apoptozy w przeciwieństwie do martwicy jest planowy i dobrze kontrolowany przez reakcje wewnątrzkomórkowe [3].

W odpowiedzi na czynnik uszkodzający prawie zawsze dochodzi zarówno do martwicy jak i apoptozy komórek, ale ich udział procentowy może być bardzo różny. To determinuje dalsze losy uszkodzonych tkanek lub narządów. Apoptoza jest charakterystyczna zarówno dla ostrych uszkodzeń, ostrych zapaleń i ostrej niewydolności wątroby, ale także dla chorób przewlekłych przewlekłe. Umożliwia eliminację komórek uszkodzonych, z nagromadzoną zbyt dużą liczbą mutacji DNA, starych, zainfekowanych zwykle w sposób niemal „niezauważony” dla integralności całego narządu i jego nie zaburzonego funkcjonowania [4].

Wielu badaczy rozróżnia pojęcie apoptozy i programowanej śmierci komórkowej. Według tak sformułowanych definicji programowana śmierć komórki, inaczej apoptoza fizjologiczna, dotyczy tylko komórek zużytych w procesie fizjologicznego starzenia się materiału biologicznego. Natomiast apoptoza patologiczna ma miejsce w komórkach uszkodzonych w sposób nieplanowy (zakażonych, eksponowanych na zewnątrzpochodne czynniki fizyczne i chemiczne). W obu przypadkach procesy biochemiczne wewnątrzkomórkowe są jednakowe (wykorzystują te same układy białkowe, enzymatyczne, te same źródła energii). Różnią się zasadniczo pod względem czynnika sprawczego – wywołującego śmierć apoptotyczną komórki (wykorzystujące odmienne receptory i ligandy śmierci) [2].

Drogi indukcji apoptozy

Apoptoza wywoływana jest przez szereg czynników zewnętrznych i wewnątrzkomórkowych: dysregulacja procesów metabolicznych, cytokiny, wirusy, leki przeciwnowotworowe, stres hypoksydacyjny i wiele innych. Czynniki te inicjują dwójakiego rodzaju mechanizm spustowy: zewnętrzny i wewnątrzpochodny. Drogą zewnątrzpochodną pobudzane zostają tzw. receptory śmierci znajdujące się na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Połączenie receptorów z ich ligandami przekazuje dalej tzw. sygnały śmierci inicjujące kaskadę proteolityczną kaspaz. Następnie sygnał dociera do mitochondriów, gdzie zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej i wyciek cytochromu c do cytoplazmy uruchamia kolejne etapy apoptozy [5]. Drogą wewnątrzpochodną sygnały śmierci w pierwszej kolejności oddziałują na błonę mitochondrialną aktywując czynniki pro-apoptotyczne, z których część pobudza bezpośrednio lub pośrednio kaskadę proteolityczną kaspaz, inne natomiast realizują niezależny od kaspaz mechanizm apoptozy. Przepuszczalność błony mitochondrialnej (stan kanałów błonowych) regulowana jest przez rodzinę białek bcl-2. Jedne pełnią funkcję pro inne anty-apoptotyczną, w zależności od stanu komórki i przebiegających w niej procesów. Aktywacja poszczególnych białek i skonfigurowanie kanałów błonowych mitochondrium stanowi tzw. próg, po przekroczeniu którego niemożliwe jest zatrzymanie procesu apoptozy (ang. *point-of-no return*) [6].

Znany jest jeszcze trzeci mechanizm apoptozy – zewnętrzny, zależny od limfocytów T cytotoksycznych (CTLs) – układ perforyny/granzymy B. Aktywowane CTLs wydzielają z ziarnistości cytoplazmatycznych do przestrzeni międzykomórkowej perforyny, które wbudowując się do błony

komórki docelowej tworzą kanał błonowy. Przez niego do cytoplazmy dostają się granzymy B (enzymy proteolityczne), których substratami są różne białka (strukturalne, enzymatyczne, regulatorowe). Granzymy B proteolizują również kaspazy (powstają ich formy aktywne), indukując w ten sposób apoptozę komórki [3].

Apoptoza komórek wątrobowych jest fundamentalną komponentą ostrych i przewlekłych chorób wątroby. Ma złożone i różnicowane znaczenie dla narządu będącego największym gruczołem zewnątrzwydzielniczym w organizmie człowieka, zintegrowanego z przewodem pokarmowym, pełniącym również rolę detoksykacyjną i immunologiczną. Zarówno zapalenie, włóknienie jak i regeneracja czy odbudowa tkanki wątrobowej związane są z procesami apoptotycznymi. Z jednej strony apoptoza umożliwia usunięcie zdegenerowanych i uszkodzonych komórek, z drugiej – pobudza proces włóknienia wątroby, w następstwie czego dochodzi do jej patologicznej przebudowy (marskość) z następstwami w postaci nadciśnienia wrotnego i niewydolności wątroby. Prawdopodobny mechanizm pobudzania włóknienia przez apoptozę polega na aktywacji i stymulacji komórek gwiaździstych przez fagocytowane przez nie ciała apoptotyczne (ciałka Councilmanna) do produkcji kolagenu. Dotychczas prowadzone prace doświadczalne i kliniczne wskazują, że hamowanie apoptozy zmniejsza postęp fibrogenyzy i oddala w czasie jej następstwa. Istnieją więc potencjalne możliwości wykorzystania leków wpływających na procesy apoptozy w leczenie i/lub zapobieganiu następstwom chorób wątroby [7].

Zewnątrzpochodna droga indukcji apoptozy (receptorozależna) polega na wzajemnym oddziaływaniu tzw. ligandów śmierci: czynnik martwicy nowotworów (TNF α), Fas ligand (FasL/CD95L), ligand indukujący związany z TNF (TRAIL) z odpowiednimi receptorami błonowymi hepatocytów. Droga wewnątrzpochodna (mitochondrio-zależna) zapoczątkowywana jest zwykle przez czynniki wewnątrzkomórkowe: mutacje DNA, brak czynników wzrostu, zaburzenia metaboliczne czy zaburzenie przylegania do macierzy zewnątrzkomórkowej lub komórek sąsiadujących [8]. Powyższe mechanizmy indukcji apoptozy nie wykluczają się nawzajem, ale mogą przebiegać jednocześnie, wtedy ulegają wzajemnemu wzmocnieniu (powstaje synergistyczny potencjał apoptotyczny).

Receptory i ligandy apoptozy – ekspresja w wątrobie

Receptory apoptozy (DRs) to transbłonowe białka typu I-II, należące do rodziny czynników TNF (martwicy nowotworów) i NGF (wzrostu neuronów), pobudzane przez odpowiednie ligandy lub eksperymentalnie konstruowane przeciwciała. Znanych jest 6 receptorów: DR1-DR6, z których najważniejszą rolę pełnią Fas, TNF-R1, TRAIL, biorąc udział zarówno w fizjologicznie jak i patologicznie indukowanej apoptozie [9,10].

Poszczególne komórki miększu wątroby prezentują odmienny profil ekspresji receptorów apoptozy. Implikuje to różną podatność na apoptozę i różne konsekwencje tych procesów (fizjologicznych i patologicznych) wśród poszczególnych linii komórkowych.

Komórki właściwe wątroby – hepatocyty – produkują Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 oraz TRAIL-R2. Rola dwóch pierwszych

receptorów nie budzi wątpliwości, została potwierdzona w licznych doświadczeniach z agonistycznym przeciwciałem anty-Fas lub egzogennym TNF- α [11]. Nie do końca jasna jest rola receptorów TRAIL. *In vitro* rekombinowana, rozpuszczalna forma TRAIL zmieszana z hodowlą hepatocytów ludzkich indukuje apoptozę, ale nie potwierdziły tego badania na zwierzętach. Być może taka dyskrepancja wyników ma związek z odmiennością agonistów/ligandów TRAIL u poszczególnych gatunków ssaków [12]. Wydaje się, że, w porównaniu do Fas i TNF-R1, rola tych receptorów (mimo ich pełnej ekspresji na hepatocytach) jest znikoma.

Komórki dróg żółciowych – cholangiocyty – produkują Fas. Droga apoptozy Fas-zależna jest dominująca w tej linii komórkowej. Rola TRAIL i TNF nie jest do końca jasna. Są potwierdzone doniesienia na temat udziału układu TRAIL w rozwoju *cholangiocarcinoma* CCC. Receptory TRAIL i swoiste dla nich ligandy pełnią tu rolę przeciwnowotworową [13].

Komórki gwiazdziste wątroby (HSC) wydają się być słabo wrażliwe na procesy apoptotyczne, ale w sprzyjających warunkach ulegają aktywacji. W jądrach komórkowych zachodzą zmiany ekspresji genów prowadzące do całkowitej zmiany funkcji komórek HSC. Upodabniają się do komórek dendrytycznych i limfocytów T cytotoksycznych. Stają się w ten sposób wrażliwe na apoptozę za pośrednictwem białek TRAIL-R2 [14].

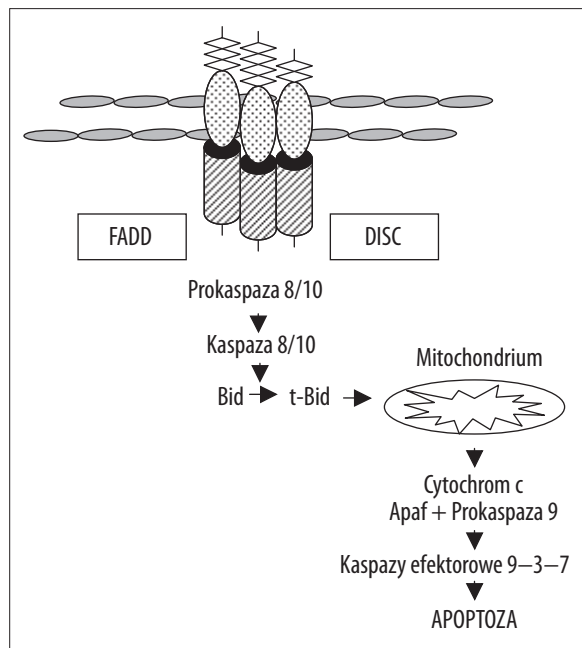
Komórki Kupffera mogą ulegać apoptozie na drodze aktywacji receptora TNF- α . Jednak zasadniczy ich udział w procesach apoptozy polega na modulowaniu i w efekcie pośredniczeniu w apoptozie pozostałych komórek wątrobowych. Wykorzystują do tego mechanizm aktywacji układu Fas/FasL. Biorą udział w immunoregulacji procesów patologicznych w wątrobie.

Komórki śródbłonkowe zatok wątrobowych ulegają apoptozie za pośrednictwem wydzielanych białek Fas i TNF-R1 [12]. Przypuszcza się, że rola tych mechanizmów może mieć patogenetyczne znaczenie w krwotocznej martwicy wątroby oraz z różnych postaciach krwotoków wewnątrzwątrobowych.

Kaskada sygnałów w przebiegu apoptozy

Transbłonowe przekazywanie sygnałów inicjujących apoptozę przebiega w podobny sposób, mimo, że w proces ten zaangażowane są trzy różne receptory błonowe i różne ich ligandy. Każdorazowo połączenie regionu N-końcowego receptora z ligandem śmierci skutkuje zmianą konformacji C-końcowego regionu receptora. Następuje oligomeryzacja zakotwiczonych w cytoplazmie domen FADD (związane z Fas domeny śmierci, ang. *Fas associated death domain*). FADD zawiera efektor inicjujący kaskadę proteolityczną kaspaz, począwszy od nieaktywnych form prokaspazy 8 i 10. Powstały kompleks DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) kontynuuje proteolizę kolejnych prokaspaz: 9-3-7. Formowanie kompleksu DISC podlega kontroli niedawno opisanych białek c-FLIP (ang. *FLICE-inhibitory proteins*), których rolą jest hamowanie apoptozy. C-FLIP łączy się kompetycyjnie z DISC inaktywując prokaspazę 8, uniemożliwiając dalszą kaskadę proteolizy kolejno przyłączanych enzymów [11]. W ten sposób inicjują apoptozę układy receptorowe Fas i TRAIL-R1, TRAIL-R2 (Rycina 1).

Układ TNF- α /TNF-R1 jest bardziej rozbudowany i przekazuje sygnały zarówno pro jak i antyapoptotyczne. Po połączeniu



Rycina 1. Apoptoza zależna od receptorów śmierci.

z ligandem także zmienia się konformacja regionu cytoplazmycznego i zakotwiczone w cytoplazmie białka TRADD (kompleks I) (ang. *TNF-R-associated death domain*), podobnie jak FADD, aktywują molekuly sygnałowe (czynnik związany z TNF TRAF-2, białko pośredniczące RIP, proteiny homologiczne do innych domen śmierci RAIDD), skupiając je w kompleks receptorowy II aktywujący dalej kaskadę kaspaz, począwszy od kaspazy 8, 10 i 2 [11]. Połączenie RIP i TRAF-2 aktywuje również kinazę c-Jun (ang. *c-jun NH₂-terminal kinase* JNK) inicjującą transkrypcję genów odpowiedzialnych za apoptozę. Niezależnie od przekazania pozytywnego sygnału dla apoptozy, utworzenie takiego kompleksu aktywuje też kinazę proteinową NF- κ B (ang. *NF- κ B-inducing kinase* NIK) pobudzającą następnie kompleks katalitycznej kinazy I- κ B (ang. *I- κ B-kinase complex* IKK). Skutkuje to translokacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra komórkowego (poprzez fosforylację białka I- κ B α) i zapoczątkowanie transkrypcji genów, których produkty są znanymi inhibitorami apoptozy (*survival factors*). Inhibitory apoptozy działają na drodze hamowania wzajemnych reakcji JNK lub blokowania proteolizy kolejnych cząsteczek kaspaz [15].

Rodzaj sygnałów i dalszy przebieg procesów apoptotycznych różnicują komórki na dwa typy. W komórkach typu I aktywacja kompleksu kaspaz inicjatorowych 8 i 10 pobudza następne reakcje proteolityczne w tzw. kaskadzie kaspaz (DISC aktywuje kaspazę 3 etc.) i prowadzi ostatecznie do apoptozy. W komórkach typu II, do których należą hepatocyty i cholangiocyty, procesowi temu towarzyszy włączenie również drogi wewnątrzpochodnej, mitochondrio-zależnej, co powoduje amplifikację (wzmocnienie) sygnału pozytywnego dla apoptozy [9]. Obie te ścieżki przebiegają niemal równocześnie. Jest to możliwe poprzez odłączenie przez aktywowane kaspazy 8 i 10 domeny BH3 z cząsteczki białka Bid (powstaje t-Bid). Nowe białko jest transportowane do mitochondrium, skąd reorganizując grzebień mitochondrialny i oddziałując z Bak i Bax uwalnia czynniki proapoptotyczne (cytochrom c, AIF, OMI/HtrA2, Smac/Diablo) do cytosolu. Ta przejściowa przepuszczalność (otwarcie kana-



łów błonowych) błony mitochondrium jest w tym wypadku inicjowana przez receptor TNF, ale taką rolę mogą pełnić też inne czynniki wywołujące załamanie się potencjału błonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$). Zmiana potencjału błonowego jest jednym z pierwszych objawów rozpoczynającej się w komórce apoptozy. Potencjał błonowy ujemny wewnątrz mitochondrium zwiększa napływ Ca^{++} , co również stanowi sygnał proapoptotyczny. Spadek potencjału poniżej wartości krytycznej (tzw. potencjał bramkujący) poprzez depolaryzację otwiera kanały błonowe mitochondrium. W cytosolu cytochrom c pochodzący z mitochondrium wiąże Apaf-1 i nieaktywną prokaspazę 9, które razem tworzą apoptosom. Inicjuje to typową proteolityczną kaskadę kaspaz efektorowych 9-3-7 [16]. Okazuje się, że zastosowanie np.: cyklosporyny A, trifluoroperazyny, które hamują TNF-zależny wypływ cytochromu c z mitochondrium, przyczynia się do zwolnienia aktywacji kaspaz i hamowania apoptozy. Zatem umiejętność regulowania czynności kanałów błonowych mitochondriów byłaby ogromnie przydatna w praktyce klinicznej do ograniczania bądź nasilania apoptozy hepatocytów w zależności od potrzeb terapeutycznych [7].

Bcl-2

Przedstawiciele rodziny białek Bcl-2 mają właściwości zarówno pobudzania (Bak, Bax, Bcl-Xs, Bag, Bid, Bik, Hrk, Bad) jak i hamowania apoptozy (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, A1) drogą odmiennych reakcji, poprzez formowanie różnych kompleksów białkowych i przyłączania różnorodnych cząsteczek białkowo-lipidowo-węglowodanowych. Swoista równowaga między aktywnością białek bcl-2 umożliwia przeprowadzenie komórki przez skomplikowane procesy apoptotyczne kontrolowane na różnych poziomach. Hepatocyty nie wydzielają Bcl-2, w ograniczonym zakresie produkują Bcl-X_L, w dużych ilościach natomiast białka proapoptotyczne – Bax i Bak, tak więc rodzina Bcl-2 w wątrobie odpowiada przede wszystkim za promowanie apoptozy [9].

Apoptoza w wybranych chorobach wątroby

Nowotwory wątroby i dróg żółciowych

Komórki *hepatocarcinoma* HCC i *cholangiocarcinoma* CCC charakteryzują się tzw. opornością na apoptozę. Obok typowego dla każdej komórki nowotworowej uniezależnienia się od czynników i inhibitorów wzrostu, zdolności do przerzutowania i podtrzymywania angiogenezy, wykazują również nadekspresję czynników hamujących apoptozę (inhibitor białek apoptozy IAP, ang. *inhibitor of apoptosis protein*, inhibitor czynników FADD i FLICE – FLIP ang. *FADD/FLICE/caspase-8 inhibitory protein*) i/lub zmniejszoną a nawet brak ekspresji czynników aktywujących apoptozę (receptor Fas/CD95/APO-1) [17]. Jednak ekspresja FasL jest znacznie większa, co prawdopodobnie umożliwia (na drodze niszczenia komórek sąsiednich) ekspansję guza i tłumaczy częściowo właściwości metastatyczne tkanek nowotworowych. Dzięki wydzielanemu FasL komórki nowotworowe są uprzywilejowane immunologicznie. Mogą inicjować apoptozę w komórkach pełniących funkcje przeciwnowotworowe (limfocytach posiadających na powierzchni receptory Fas). Nowotwory wątrobowokomórkowe o wysokiej ekspresji FasL mają znacznie gorsze rokowanie od tych z niską ekspresją FasL.

Niezależnie od układu FasL/FasAg, układ TRAIL pełni rolę indukującą apoptozę w nowotworach wątroby, podczas gdy

prawidłowe hepatocyty nie są wrażliwe na jego obecność. Wydaje się więc, ligandy TRAIL (agoniści blokujący aktywność białek receptorowych) mogą być wykorzystywane jako czynniki przeciwnowotworowe.

W komórkach HCC zaobserwowano ekspresję bcl-2, którego nie syntezują prawidłowe hepatocyty. Zapobiega on proapoptotycznemu oddziaływaniu układu Fas/FasL, przez co umożliwia niekontrolowaną proliferację komórek nowotworowych. Podobne zjawisko obserwuje się w CCC związanym z przewlekłą cholestazą zewnątrzwątrobową lub w przebiegu pierwotnych cholestazycznych chorób wątroby (PBC – pierwotna marskość żółciowa wątroby, PSC – pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, atrezja dróg żółciowych). Bcl-2 prawidłowych cholangiocytów chroni je przed apoptozą wywołaną przez stały wpływ toksycznych kwasów żółciowych i innych składników żółci. Natomiast w nowotworach wywodzących się z dróg żółciowych patologiczna nadekspresja bcl-2 umożliwia ich niekontrolowany rozrost [18,19].

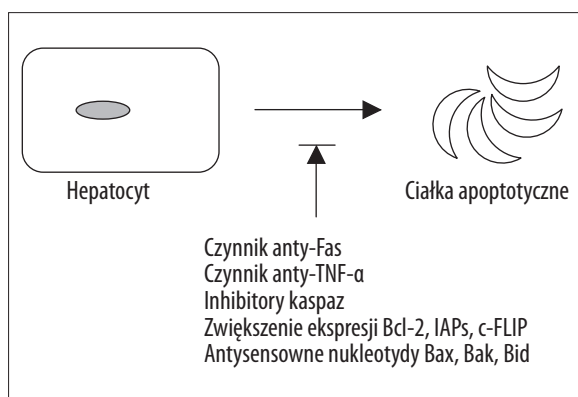
Choroba alkoholowa wątroby

W alkoholowym zapaleniu wątroby apoptoza hepatocytów pełni znaczącą rolę w patogenezie choroby. Liczba ciałek apoptotycznych (nasilenie apoptozy) koreluje z ciężkością przebiegu choroby, wzrasta u pacjentów z wysoką bilirubinemią i podwyższoną aktywnością GOT oraz 4 stopniem stłuszczeniowego zapalenia wątroby (*steatohepatitis*) [20]. Mechanizmy apoptozy są tutaj głównie oparte na drodze receptoro-zależnej zewnątrzpochodnej oraz wewnątrzpochodnej, mitochondrio-zależnej, związanej ze stresem oksydacyjnym.

Postuluje się, że alkoholowe uszkodzenie wątroby wywołują przede wszystkim liczne aktywne wolne rodniki tlenowe powstające w trakcie metabolizmu alkoholu przy udziale cytochromu P450 2E1, a prowadzące do patologicznej peroksydacji lipidów. Jest to przyczyną uszkodzenia mitochondriów i uwolnienia czynników proapoptotycznych, np.: cytochromu c. Dochodzi wtedy do indukcji apoptozy drogą mitochondrio-zależną, wewnątrzpochodną [21].

Udział mechanizmów zależnych od receptorów śmierci DRs pełni równie ważną tutaj rolę. U pacjentów z alkoholowym zapaleniem wątroby ASH wykrywa się znacznie wyższą ekspresję zarówno receptorów Fas i TNF jak i rozpuszczalnego antygeny Fas i FasL w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto obecne jest w tych przypadkach zjawisko nie obserwowane w innych chorobach wątroby – wzajemne indukowanie apoptozy hepatocytów z obecnym receptorem Fas (CD95/APO-1) na powierzchni przez hepatocyty wydzielające Fas ligand (FasL). Takie indukowanie apoptozy komórek sąsiadujących zwane jest „śmiercią bratobójczą”. Zwiększonej ekspresji Fas i FasL towarzyszy również nasiloną ekspresją TNF i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Stężenie surowicze wymienionych cytokin i ligandów śmierci silnie koreluje ze śmiertelnością w przebiegu choroby alkoholowej wątroby. Alkohol może również uwrażliwiać hepatocyty na apoptozę zależną od TNF- α poprzez zmniejszanie stężenia zredukowanego glutationu GSH w mitochondriach i obniżać błonowy potencjał redukcyjny komórek [22,23].

Niezależnie od udziału poszczególnych mechanizmów w apoptozie hepatocytów – próby terapeutyczne z lekami hamującymi wybrane etapy apoptozy (inhibitory kaspaz, przeciwcia-



Rycina 2. Inhibicja apoptozy w chorobach wątroby – opcje terapeutyczne.

ła antyTNF- α , czynniki nasilające ekspresję tzw. inhibitorów apoptozy) mogą w przyszłości okazać się ważnym elementem wspomagającym leczenie pacjentów w skrajnie zaawansowanym stadium choroby wątroby (Rycina 2).

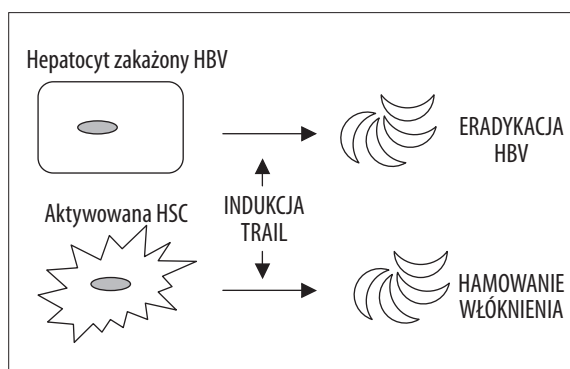
Wirusowe zapalenie wątroby

W przebiegu przewlekłych zakażeń HBV i HCV wątroby dochodzi do uszkodzenia narządu, głównie na drodze procesów immunologicznych. Limfocyty T cytotoksyczne CTLs rozpoznają epitopy wirusowe prezentowane na powierzchni hepatocytów zakażonych (przy współdziałaniu antygenów MHC klasy I). Indukuje to szereg procesów, w tym, za pośrednictwem błonowych receptorów śmierci, również apoptozę. Wydaje się, że apoptoza pełni kluczową rolę w patogenezie pwzw, choć nie do końca jeszcze poznana.

Ciałka (pęcherzyki) apoptotyczne, wcześniej znane jako ciała Councilmana lub ciała kwasochłonne, są wyrazem toczącej się w wątrobie apoptozy, niezależnie od rodzaju mechanizmów: za pośrednictwem układu Fas, TNF czy perforyny/granzymy. Aktywność kaspaz koreluje z nasileniem uszkodzenia tkanki wątrobowej, ekspresja Fas natomiast z aktywnością zapalną w badaniu histopatologicznym [24,25].

Apoptoza za pośrednictwem układu Fas może być indukowana zarówno przez poszczególne cząstki wirusowe jak i przez cytokiny (interleukina-1, Il-1) wydzielane w reakcji na obecność wirusów. Jednakże złożoność procesów apoptotycznych w przebiegu wzw polega na tym, że te same białka wirusowe, np.: HBx, białko rdzeniowe HCV mogą pobudzać hepatocyty do apoptozy, ale również je przed nią chronić (w mechanizmie stymulacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i drogi JNK HBx hamuje przebieg apoptozy Fas-zależnej na etapie uwolnienia cytochromu c z mitochondriów) [26,27]. Hamowanie apoptozy hepatocytów wydaje się być kluczowym elementem warunkującym przetrwanie zakażenia i przewlekanie się choroby.

W przebiegu wzw typu B i C ma miejsce również zwiększona ekspresja TNF-R1 w hepatocytach oraz TNF- α w mononuklearach krwi obwodowej. W tym wypadku antygen HBx HBV pełni rolę uwrażliwiania hepatocytów na apoptozę poprzez wzmocnienie ekspresji TNF-R1, a antygen rdzeniowy HCV, poprzez łączenie się z wewnątrzblonową domeną TNF-R1, indukuje apoptozę. Jednak mechanizm zależny od TNF-R1 prowadzi też do syntezy NF- κ B, czynnika pośredniczącego



Rycina 3. Indukcja apoptozy w chorobach wątroby – opcje terapeutyczne.

w hamowaniu apoptozy [28,29]. Zatem te same białka wirusowe (np.: HBx i rdzeniowe HCV) wykazują właściwości zarówno pro jak i antyapoptotyczne.

Rola modulowania (nasilenia bądź hamowania) apoptozy w leczeniu wzw typu B i C nie jest jeszcze jednoznacznie określona, ale wydaje się być dobrą wskazówką dla przyszłych prac badawczych. Podstawowym czynnikiem ograniczającym skuteczność leczenia wzw typu B, a tym samym eradykacji HBV, jest obecność cccDNA (ang. *covalently closed circulate DNA*) w komórce zakażonego hepatocytu. Apoptoza wszystkich hepatocytów zakażonych HBV (tych aktywnie replikujących wirusy, jak i wydzielających jedynie cccDNA) jest obecnie jedyną potencjalną drogą skutecznej eradykacji zakażenia HBV [9]. Ten sam mechanizm aktywacji apoptozy (oparty na różnicowanej wrażliwości zainfekowanych komórek na mechanizmy TRAIL-zależne) zakażonych hepatocytów mógłby wywołać jednocześnie apoptozę pobudzonych komórek gwiaździstych HSC i tym samym hamować produkcję kolagenu, a w efekcie proces włóknienia wątroby związany z toczącym się w niej procesem zapalnym (Rycina 3). Omówione wykorzystanie układu TRAIL miałyby więc wyjątkowe znaczenie kliniczne w terapii i zapobieganiu następstwom pwzw.

Choroby cholestatyczne wątroby

Wzrost stężenia kwasów żółciowych w przebiegu cholestazy różnego pochodzenia leży u podstaw patogenezy wielu chorób wątroby. Udział kwasów żółciowych w indukowaniu apoptozy hepatocytów, cholangiocytów i innych komórek miąższu wątrobowego przyczynia się między innymi do rozwoju następstw w postaci włóknienia, marskości i nowotworów (pierwotnego raka wątrobowokomórkowego HCC i raka wywodzącego się z dróg żółciowych CCC). Ma to swoje implikacje kliniczne i terapeutyczne.

Apoptoza hepatocytów w chorobach cholestatycznych przebiega na drodze pobudzania układu Fas. W przypadku niskiej ekspresji receptora Fas (z powodu np.: mutacji genu lub jego braku w niektórych komórkach) apoptoza jest realizowana za pośrednictwem receptorów TRAIL/TRAIL-R2. Zaburzona (nadmierna) synteza kwasów żółciowych lub ich nieprawidłowy metabolizm (upośledzone wydalanie z hepatocytów) uwrażliwia komórki wątrobowe na apoptozę za pośrednictwem receptorów Fas i/lub TRAIL. Wykorzystanie inhibitorów kaspazy 8/10 i antysensownych oligonukleotydów Bid może mieć w przyszłości kluczowe znaczenie w le-



czeniu skutków nadmiernego gromadzenia się toksycznych kwasów żółciowych w wątrobie i prewencji nowotworów z komórek dróg żółciowych [30] (Rycina 2).

Choroba Wilsona

Podstawowy mechanizm uszkodzenia wątroby w chorobie Wilsona polega na działaniu wolnych rodników powstających w wyniku nadmiernego gromadzenia miedzi lub oksydacyjnego uszkodzenia organelli komórkowych. Badania bioptatów wątrobowych pacjentów z wątrobową postacią choroby Wilsona wskazują na znaczny udział apoptozy w patogenezie choroby. Stres oksydacyjny w wyniku nadmiernego gromadzenia miedzi pobudza drogę Fas-zależną. Obserwuje się w tym przypadku tzw. śmierć bratobójczą sąsiadujących komórek (produkujących bądź FasL bądź receptor Fas) – podobnie jak w chorobie alkoholowej wątroby. Znaczenie antyapoptotyczne, a więc w tym wypadku lecznicze (jako swoista alternatywa dla transplantacji wątroby) mają zarówno przeciwciała anty FasL jak i inhibitory kaspaz [31] (Rycina 2).

Autoimmunologiczne choroby wątroby

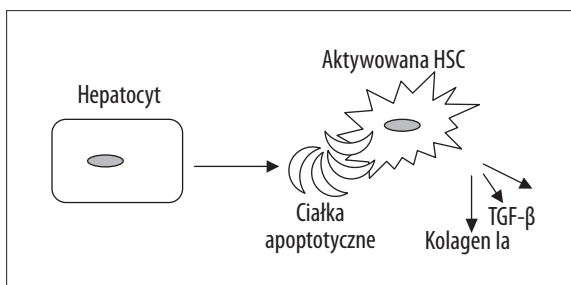
W autoimmunologicznym zapaleniu wątroby (AIH) i pierwotnej marskości żółciowej (PBC) podstawowym mechanizmem patogenetycznym wydaje się być śmierć komórek wątrobowych, w szczególności apoptoza, prawdopodobnie z udziałem limfocytów cytotoksycznych (CTLs). W obu przypadkach droga zależna od FasL (na powierzchni CTLs) oraz układu perforyny – granzymy (enzymów wydzielanych z ziarnistości CTLs) w głównej mierze odpowiada za apoptozę hepatocytów [32].

Cholestaza w przypadku PBC, podobnie jak w innych cholestatycznych chorobach wątroby, jest silnym induktorem apoptozy. U osób z PBC leczonych kwasem ursodeoksycholowym (UDCA) obserwuje się istotnie mniejszą liczbę ciałek apoptotycznych, mierzonych metodą TUNEL. W ostatnich latach popularność wśród naukowców zyskuje teza, że same ciała apoptotyczne mogą stanowić źródło immunogennych form autoantygenu, które u osób predysponowanych mogą być podstawą w rozwoju chorób z autoagresji, zwłaszcza AIH [33]. W obu chorobach obserwuje się również nasiloną aktywność makrofagów wydzielających cytokiny w odpowiedzi na procesy apoptozy toczące się w mięszu wątroby.

Związek między apoptozą, zapaleniem i włóknieniem wątroby

Apoptoza hepatocytów i włóknienie tkanki wątrobowej to jedne z najważniejszych cech większości ostrych i przewlekłych chorób wątroby (wirusowych, metabolicznych, cholestatycznych, uwarunkowanych genetycznie). Procesy apoptotyczne obserwuje się głównie w ostrej fazie choroby, w mniejszym nasileniu również w fazie przewlekłej. Włóknienie jest następstwem (niezależnie od etiologii) uszkodzenia wątroby o charakterze zapalnym wskutek pobudzenia komórek gwiaździstych do nadmiernej produkcji kolagenu. Obserwacje te sugerują, że istnieje związek między apoptozą, zapaleniem i włóknieniem wątroby [9].

Ciała apoptotyczne powstałe w procesie apoptozy są fagocytowane przez sąsiednie komórki wyspecjalizowane (makrofagi, fibroblasty, komórki nabłonkowe), co zapobiega



Rycina 4. Związek między apoptozą a włóknieniem wątroby.

rozwinieciu się zapalenia (mobilizacji komórek immunokompetentnych, wydzielaniu cytokin prozapalnych) w miejscu uszkodzenia mięszu wątroby. W wątrobie za fagocytozę odpowiedzialne są komórki Kupffera zlokalizowane w przestrzeni międzycelkowej oraz komórki gwiaździste – w przestrzeni Dissego. Fagocytoza ciałek apoptotycznych przez obie linie komórkowe stymuluje je do produkcji czynnika transkrypcyjnego TGF-β1. W przypadku komórek gwiaździstych TGF-β jest czynnikiem transkrypcyjnym dla syntezy mRNA kolagenu Ia, czego skutkiem jest włóknienie wątroby [34] (Rycina 4).

Wydaje się więc, że inhibicja apoptozy hepatocytów lub fagocytozy ciałek apoptotycznych przez HSC lub wreszcie zahamowanie szlaku sygnałowego dla produkcji kolagenu może mieć znaczenie w profilaktyce oraz strategii terapeutycznej włóknienia wątroby. Ponadto farmakologiczne kontrolowane inicjowanie apoptozy (np.: przez podawanie gliotoksyny – swoistego agonisty receptora TRIAL-R2 – charakterystycznego dla HSC) pobudzonych komórek gwiaździstych mogłoby stanowić drugi sposób na przeciwdziałanie włóknieniu wątroby [35].

Badania prowadzone w ostatnich latach dowiodły, że konsekwencją apoptozy może być stymulowanie reakcji zapalnej. Podważa to dotychczasową wiedzę w zakresie procesów apoptotycznych, których podstawową cechą jest brak wywoływania zmian zapalnych. Okazało się, że hepatocyty ulegające apoptozie drogą Fas-zależną i TNF-zależną uwalniają chemokiny (w szczególności: CXC KC i MIP-2, ang. *macrophag inflammatory protein-2*), czynniki chemotaktyczne, odpowiedzialne za migrację neutrofilów z zatok do mięszu wątroby i gromadzenie ich w przestrzeni międzykomórkowej [36]. Synteza chemokin CXC KC i MIP-2 następuje w wyniku translokacji jądrowej czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activator protein-1*) i swoistej transkrypcji genów. Eksperymentalne zastosowanie inhibitora kaspazy-3 (blokującego końcowy etap apoptozy) spowodowało zahamowanie wydzielania chemokin i produkcji AP-1. Nie obserwowano bezpośredniego związku między aktywacją układu FAS lub TNF a reakcją neutrofilów, jednak obserwowana migracja komórek zapalnych w miejsca nagromadzenia pęcherzyków apoptotycznych była konsekwencją dokonanej apoptozy. Prawdopodobnie zdrowe komórki, w bezpośrednim sąsiedztwie z hepatocytami ulegającymi apoptozie lub ciałkami apoptotycznymi, mogą również wydzielać mediatory reakcji zapalnej [20]. Implikacje terapeutyczne tych obserwacji nie znalazły dotychczas zastosowania w praktyce klinicznej. Hamowanie apoptozy w celu ograniczenia odpowiedzi zapalnej wydaje się być mało przydatne w wirusowych zapaleniach wątroby, gdyż ograniczyłoby jednocześnie naturalny proces usuwania zakażonych hepatocytów.

1. Johar D, Roth JC, Bay GH i wsp: Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer. *Rocz Akad Med Białymst.* 2004; 49:31–39
2. Alison MR, Sarraf CE: Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut.* 1994; 35: 577–81
3. Reed JC: Mechanism of apoptosis. *J Am Pathol.* 2000; 157(5): 1415–30
4. Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K: Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunnel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci.* 2000; 47(3): 167–75
5. Ferri KF, Kroemer G: Organelle-specific initiator of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(11): E255–63
6. Wang X: The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15(22): 2922–23
7. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K i wsp: Apoptosis in liver diseases – detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit.* 2005; 11(11): RA337–45
8. Ghavami S, Kerkhoff C, Los M: Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 169–75
9. Yoon JH, Gores GJ: Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol.* 2002; 37: 400–10
10. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL i wsp: Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 331–67
11. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Aldachi M i wsp: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993; 364: 806–9
12. Jo M, Kim TH, Seol DW i wsp: Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med.* 2000; 6: 564–67
13. Tanaka S, Sugimachi K, Schirabe K i wsp: Expression and antitumor effects of TRAIL in human cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2000; 32: 523–27
14. Taimr P, Higuchi H, Kocova E i wsp: Activated human stellate cells preferentially express death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Gastroenterol.* 2002; (Supl): 112–284
15. Wajant H, Scheurich P: Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 21: 19–32
16. Jiang X, Wang X: Cytochrome c promotes caspases-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* 2000; 275(40): 31199–203
17. Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N i wsp: The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance *in vivo*? *Hepatol.* 1999; 30: 413–21
18. Celli A, Que FG: Dysregulation of apoptosis in the cholangiopathies and cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis.* 1998; 18: 177–85
19. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ: Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver diseases: an overview. *Semin Liver Dis.* 1998; 18: 105–14
20. Natori S, Rust C, Stadheim LM i wsp: Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 2001; 37: 248–53
21. Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 267–71
22. Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB: Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 2098–108
23. Colell A, Garcia-Ruiz C, Miranda M i wsp: Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes necrosis factor. *Gastroenterol.* 1998; 115: 1541–51
24. Bantel H, Luger A, Poremba C i wsp: Caspases activation correlates with the degree of inflammatory liver in chronic hepatitis C virus with infection. *Hepatol.* 2001; 34: 758–67
25. Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N i wsp: Fas antigen expression in liver tissue of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 1996; 24: 1–7
26. Pan J, Duan LL, Sun BS, Feitelson MA: Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol.* 2001; 82: 171–82
27. Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E i wsp: Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12140–46
28. Marinou G, Naoumov NV, Rossol S i wsp: Tumor necrosis factor in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterol.* 1995; 108: 1453–63
29. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R i wsp: Hepatitis C virus protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol.* 1998; 72: 3691–97
30. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ i wsp: Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterol.* 1999; 117: 669–77
31. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A i wsp: Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med.* 1998; 4: 588–93
32. Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y: Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatol.* 1997; 26(6): 1399–405
33. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J: Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med.* 1995; 181(4): 1557–61
34. Torok NJ, Taimr P, Friedman SL, Gores GJ: Hepatocyte apoptosis enhances fibrogenic activity of human stellate cells following engulfment of apoptotic bodies – a novel link between two key features of chronic liver disease. *Hepatology.* 2001; 34: 443A
35. Wright MC, Issa R, Smart DE i wsp: Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterol.* 2001; 121: 685–98
36. Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC i wsp: Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kB-independent, caspase-3-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 49077–82

