

# Mechanizmy immunologiczne w niealkoholowej chorobie tłuszczeniowej wątroby

## Immunological mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease

Jacek Michałkiewicz<sup>1,2</sup>, Piotr Socha<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii i Immunologii IP-CZD, Warszawa

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Immunologii, Coll Medicum, Bydgoszcz, UMK, Toruń

<sup>3</sup> Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii IP-CZD, Warszawa

**Summary:** Cellular mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease are presented. The data are based on animal models of this syndrome, i.e. leptin-deficient ob/ob mice and leptin-resistant fa/fa rats and db/db mice. The following issues are discussed: a) the role of adipose tissue cellular composition, distribution, and products in the induction of systemic chronic inflammatory response, b) the significance of inflammatory mediators and microbial products (LPS) in the pathogenesis of NAFLD, and c) possible cellular mechanisms of NAFLD progression. In conclusion, NAFLD progression is connected with changes in the cellular composition and function of certain lymphocyte subsets in the liver bearing the CD4+ NKT phenotype. Their excess number and activity are related to a high production of profibrotic factors. Selective expansion of these cells depends on the appropriate cytokine pattern induced by pro-inflammatory mediators of adipose tissue and microbial products.

**Słowa kluczowe:** cytokines • adipose tissue • inflammation

**Key words:** cytokiny • tkanka tłuszczowa • zapalenie

**Adres do korespondencji:** Jacek Michałkiewicz, Zakład Mikrobiologii i Immunologii IP-CZD, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa, Polska, e-mail: jjmichalkiewicz@wp.pl

### Wstęp

NAFLD, tj. samoistna, niealkoholowa choroba tłuszczeniowa wątroby występuje najczęściej w formie stłuszczenia prostego. W części przypadków stłuszczenie prowadzi do progresji NAFLD w kierunku stłuszczenia z zapaleniem (NASH), włóknienia (fibrosis) oraz marskości (cirrhosis). Marskość może być etapem pośrednim w kierunku zmian nowotworowych (hepatocellulocarcinoma).

Czynnik lub czynniki etiologiczne inicjujące NAFLD oraz przyczyny przechodzenia tego zespołu w różne postaci zapalenia wątroby nie są znane. Patofizjologia zespołu jest bardzo złożona. Fenotyp NAFLD zależy od skojarzonego działania czynników środowiskowych (nawyki żywieniowe, tryb życia, czynniki toksyczne) oraz genetycznych, m.in. defekt w zakresie ekspresji genów kontrolujących metabolizm kwasów tłuszczowych, lipolizy, rekrutacji monocytów/makrofażów oraz węglowodanów [1].

Wtórny zespół NAFLD (znacznie rzadszy) może być wywołany działaniem leków (amidaron, glikokortykosterydy, tamoksyfen, leki stosowane w terapii HIV), zabiegami chi-

rurgicznymi (gastroplastyka, omijające połączenia jelitowe w otęłości wyłączone żywienie pozajelitowe, zaburzenia metaboliczne o podłożu genetycznym, abetalipoproteinemia, tyrozynemia i lipodystrofia [2].

Dane epidemiologiczne wskazują na bardzo ścisły związek NAFLD z czynnikami ryzyka zespołu metabolicznego: otęłością centralną, hiperglikemią, hypertrójglicydemią, niskim poziomem cholesterolu z frakcją lipidów wysokocząsteczkowych (HDL-cholesterol) oraz nadciśnieniem tętniczym. Z tego powodu NAFLD traktuje się jako manifestację kliniczną zespołu metabolicznego (MS). Częstość występowania NAFLD w USA i krajach Europy Zachodniej wynosi około 20% populacji ogólnej, co pokrywa się z częstością występowania MS (22%) [3].

Występowanie i progresja NAFLD są ściśle związane z zaburzeniami typowymi dla MS, tj. insulinoopornością (IR) oraz wzrostem i dysfunkcją metaboliczną tkanki tłuszczowej (przede wszystkim trzewnej). Ich wspólnym czynnikiem patogenetycznym jest podostra, systemowa reakcja prozapalna. Zapalenie uogólnione jest jedną z przyczyn insulinooporności (IR), której konsekwencją jest rozrost tkanki tłuszczowej, zmiany jej

składu komórkowego i wzmoczona aktywność metaboliczna. Nie wiadomo czy zapalenie wątroby w NAFLD zapoczątkowane jest lokalnie (poprzez stłuszczenie hepatocytów *per se* czy też czynniki obwodowe uwrażliwiają hepatocyty na działanie czynników pro-zapalnych. Obecnie uważa się, że szereg czynników obwodowych (generalnie produkty tkanki tłuszczowej, zwłaszcza trzewnej i mikroflory jelitowej) pełnią tą funkcję i aktywują złożony system komórkowy wątroby w kierunku wzmoczonych aktywności pro-zapalnych [4].

Celem pracy jest: a) przedstawienie znaczenia tkanki tłuszczowej w patogenezie NAFLD, b) opis immunologicznych mechanizmów zapalenia w NAFLD w oparciu o dane z badań doświadczalnych na modelach zwierzęcych, b) przedstawienie mechanizmów immunologicznych w wątrobie związanych z progresją NAFLD.

### **Znaczenie tkanki tłuszczowej w reakcji prozapalnej w wątrobie. Zapalenie uogólnione a insulinooporność**

Przebieg NAFLD jest ściśle związany z aktywnością metaboliczną i wielkością tkanki tłuszczowej, zwłaszcza trzewnej oraz prawdopodobnie składem ilościowym i jakościowym mikroflory jelitowej. W odpowiedzi na aktywację przez czynniki pro-zapalne (np. LPS, TNF-alfa, toksyny bakteryjne, superantygeny, etc) tkanka tłuszczowa trzewna (i w mniejszym zakresie obwodowa) produkuje wiele czynników bioaktywnych, tj. adipokiny (leptyna, adiponektyna, rezystyna), cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, TNF-alfa, etc) oraz przeciwzapalne (IL-10, IL-13, TGF-beta), visfatynę, czynniki chemotaktyczne (MCP-1, MIP-1alfa i beta, RANTES, IL-8, i inne), białka ostrej fazy-CRP, amyloid A, PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu) angiotensynogen, składniki dopełniacza i wiele innych. Tylko leptyna i adiponektyna produkowane są wyłącznie przez adipocyty. Natomiast TNF-alfa, MCP-1, visfatyna oraz IL-6, PAI-1 i inne w/wymienione mediatory produkowane są przez makrofagi oraz adipocyty i inne komórki. Z powodu lokalizacji tkanki tłuszczowej trzewnej wymienione mediatory przechodzą bezpośrednio do krążenia wrotnego wątroby, co powoduje silną aktywację oraz zmiany składu u komórkowego wątroby, zwłaszcza limfocytów oraz makrofagów (komórki Kupffera- KC). Zmiany te powodują zwiększoną wrażliwość hepatocytów na działanie czynników toksycznych lub/i pro-zapalnych. Działają one jako tzw „drugi sygnał” inicjujący przechodzenie stłuszczenia prosteo hepatocytów (hepato-steatosis-HS) w różne postacie zapalenia, włącznie z włóknieniem i marskością. Proces ten jest bardzo złożony i osobniczo-zmienny [5]

#### **Skład i aktywność metaboliczna tkanki tłuszczowej**

Tkanka tłuszczowa zawiera dojrzałe, wypełnione lipidami adipocyty umiejscowione w sieci kolagenu (zrąb), zawierający komórki zrębu naczyniowego, fibroblasty tkanki łącznej, limfocyty, makrofagi, komórki endotelium, oraz niedojrzałe adipocyty (pre-adipocyty, nie wypełnione lipidami). Lipidy stanowią 60–85% masy tkanki tłuszczowej białej, z czego 90–99% stanowią trójglicerydy, oraz niewielkie ilości dwuglicerydów, cholesterolu i fosfolipidów. Tkanka tłuszczowa jest jedynym organem ustroju o nieograniczonych możliwościach wzrostowych w każdym okresie życia. Ekspansja tkanki tłuszczowej zachodzi poprzez wzrost liczby adipocytów (hiperplazja) oraz zwiększanie ich rozmiarów (hiper-

trofia). Hipertrofia spowodowana jest akumulacją lipidów i jest odwracalna, natomiast zainicjowana hiperplazja utrzymuje się przez całe życie. Relatywny udział poszczególnych typów komórek tkanki tłuszczowej w produkcji określonych czynników humoralnych jest słabo poznany [6].

Rozrost tkanki tłuszczowej i stan zapalny tego narządu związany jest ze zwiększoną infiltracją tej tkanki przez monocyty i limfocyty krwi obwodowej. Wzrost transmigracji tych komórek do przestrzeni poza-naczyniowej spowodowany jest aktywacją endotelium naczyniowego (wzrost ekspresji adhezyn, zwłaszcza ICAM-1,2 i selektyn) przez mediatory zapalenia uwalniane przez adipocyty i makrofagi tkanki tłuszczowej. Produkcja chemokin (MCP-1, RANTES oraz MIP-1 alfa i beta) przez komórki tkanki tłuszczowej dodatkowo wzmaga migrację odpowiednio monocytów oraz limfocytów T. Migracja monocytów do tkanki tłuszczowej u myszy z otyłością pokarmową i delecją genów dla adhezyn ICAM-1 lub Mac-1 jest taka sama jak u otyłych myszy kontrolnych. Oznacza to, że w stanach otyłości monocyty migrują do tkanki tłuszczowej niezależnie od obecności cząsteczek kluczowych dla transmigracji tych komórek przez endotelium. Przy normalnej dystrybucji tkanki tłuszczowej, ilość makrofagów stanowi od 5–10% jej masy, natomiast w niektórych dietetycznych modelach eksperymentalnych ilość makrofagów w tkance tłuszczowej wzrasta aż do 60%. Makrofagi produkują większość TNF-alfa generowanego w tkance tłuszczowej i około 50% IL-6. Natomiast niedojrzałe adipocyty (pre-adipocyty) syntetyzują więcej TGF-beta (cytokina o silnym działaniu immunosupresyjnym), MCP-1 (chemoatraktant dla monocytów), angiotensynogen oraz PAI-1 aniżeli dojrzałe adipocyty, które z kolei produkują głównie leptynę i adiponektynę [7].

Limfocyty rezydujące w tkance tłuszczowej obwodowej to przede wszystkim klasyczne limfocyty T i B, zaangażowane w adaptacyjnej odpowiedzi odpornościowej. Rozrost tkanki tłuszczowej i zwiększanie jej aktywności metabolicznej i prozapalnej wzmaga migrację limfocytów i skład ich subpopulacji. Tkanka tłuszczowa trzewna zawiera liczną populację limfocytów typu NKT a stosunkowo mniej liczne limfocyty T i B. Komórki typu NKT należą do tzw atypowych limfocytów NK (naturalne komórki cytotoksyczne), które oprócz markerów błonowych limfocytów NK (CD56+) wykazują ekspresję receptorów limfocytów T. Komórki te bardzo licznie występują w wątrobie (opisano poniżej). Wykazują silne działania immunoregulacyjne (przeciw-zapalne) oraz efektorowe (zróżnicowane efekty cytotoksyczne oraz tolerogenne). Myszy z otyłością pokarmową wykazują zmniejszoną populację tych komórek w tkance tłuszczowej trzewnej (podobne zjawisko zachodzi w wątrobie u osób z NAFLD i w modelach zwierzęcych stłuszczenia wątroby). Tkanka tłuszczowa trzewna zawiera więcej makrofagów oraz wykazuje silniejsze działania pro-zapalne aniżeli tkanka tłuszczowa obwodowa. Jest też mniej wrażliwa na insulinę z powodu słabej ekspresji receptora dla insuliny [8]. Nie tylko więc masa tkanki tłuszczowej, ale przede wszystkim jej skład komórkowy i zakres zapalenia (ilość makrofagów, różnych typów limfocytów, ekspresja prozapalnych mediatorów) oraz skład i poziom ilościowy jelitowej flory bakteryjnej mogą wpływać na zakres reakcji pro-zapalnych w wątrobie i wpływać na progresję NAFLD.

#### **Insulinooporność (IS) a zapalenie**

Zapalenie ma ścisły związek z insulinoopornością (IS), podstawowym czynnikiem patogenetycznym NAFLD. Zmniejszona



wrażliwość na insulinę tkanki mięśniowej, tłuszczowej i wątroby nasila przewlekłą, systemową reakcję pro-zapalną. Niezależnie od czynnika indukującego IS zależność ta jest zawsze dwukierunkowa: każdy proces związany z zapaleniem przewlekłym będzie zmniejszał efekt działania insuliny, a IS będzie zwiększać systemową reakcję pro-zapalną. Systemowe zapalenie w NAFLD manifestowane jest przez umiarkowanie podwyższony poziom syntezy białek ostrej fazy (APP) w wątrobie, a w otyłości także w tkance tłuszczowej zwłaszcza w przypadku IS [9].

Ekspresja APP regulowana jest na poziomie transkrypcji, z udziałem 2 szlaków sygnałowych, tj. genów APP klasy I (CRP, amyloid A, składnik C3 dopełniacza) oraz II (alfa-1 antytyrypsyna, fibrynogen). Udział ilościowy poszczególnych typów APP w odpowiedzi ostrej fazy jest bardzo różny i zależy w dużej mierze od typu cytokin i różnych czynników hormonalnych generowanych w trakcie reakcji odpornościowych. Mechanizm ten optymalizuje odpowiedź APP, ochraniając jednocześnie przed nadmiernymi reakcjami pro-zapalnymi [10].

Insulina jest jednym z głównych czynników regulujących poziom APP produkowanych przez hepatocyty w odpowiedzi na mediatory generowane w trakcie odpowiedzi immunologicznej. Oprócz insuliny należą do nich: a) cytokiny typu IL-6, z których IL-6 jest głównym przedstawicielem, b) cytokiny typu IL-1 (IL-1 alfa, IL-1 beta, TNF-alfa, TNF-beta), c) glukokortykosterydy. Insulina wywiera działania przeciwzapalne blokując indukcję ekspresji większości genów APP indukowanych w hepatocytach przez cytokiny typu IL-1 oraz IL-6. Stąd w NAFLD i innych stanach przebiegających z IS oraz w niewyrównanej cukrzycy z niedoboru insuliny dochodzi do przewlekłej systemowej odpowiedzi ostrej fazy [11].

Poziom IS koreluje ze wzrostem tkanki tłuszczowej i jej aktywnością pro-zapalną (wysoka ekspresja TNF-alfa). TNF działa poprzez interakcję z dwoma typami receptorów komórkowych, tj. TNFR1 (p60) i TNFR2 (p80). Wzrost tkanki tłuszczowej wymaga w niej ekspresję TNFR. Po kontakcie TNF z receptorami komórkowymi dochodzi do ich hydrolytycznego odszczepiania z błony komórkowej. Ich poziom w surowicy wzrasta w wielu stanach infekcyjnych i nie infekcyjnych, w tym także w MS i jest przydatnym wykładnikiem systemowej aktywności tej cytokiny [12].

Mechanizm komórkowy inaktywacji receptora dla insuliny potwierdza znaczenie czynników pro-zapalnych w patogenie IS. TNF-alfa hamuje ekspresję receptora dla insuliny w komórkach (hepatocyty, adipocyty i makrofagi) poprzez indukcję szlaku kinazy N-końcowej Jun (JNK) oraz szlaku kinazy IKK $\beta$ /jądrowy czynnik transkrypcyjny  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Kinaza JNK normalnie fosforyluje komponentę c-Jun czynnika transkrypcyjnego AP-1. W przypadku insulinooporności ten szlak sygnałowy nie działa, a kinaza JNK fosforyluje reszty serynowe substratu receptora insuliny (IRS-1). Fosforylacja reszt serynowych (zamiast tyrozynowych) prowadzi do inaktywacji czynnościowej receptora dla insuliny (IR). Aktywacja kinazy IKK $\beta$  powoduje fosforylację jej substratów, tj. białkowych inhibitorów I czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B i translokację czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B z cytoplazmy do jądra komórkowego. Kinaza IKK $\beta$  nie fosforyluje IRS-1, lecz powoduje insulinooporność poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B [13]. Poziom aktywacji tego czynnika wzrasta wraz ze zwiększaniem się akumulacji lipidów w adi-

pocytach, co powoduje wzmaganie ekspresji wielu pro-zapalnych mediatorów w tkance tłuszczowej: TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta, rezystyny, oraz wielu innych czynników transkrypcyjnych dla cytokin, chemokin, receptorów komórkowych, białek odpowiedzi ostrej fazy, etc.

Skład komórkowy wątroby prawidłowej predysponuje do funkcji metabolicznych, sekrecyjnych i immunologicznych. Pomimo przewagi wielu typów komórek o potencjalnych zdolnościach cytotoksycznych układ odpornościowy wątroby wykazuje unikalną zdolność tolerowania ogromnej ilości obcych swoistości zarówno na autoantygeny (produkty komensalnej flory bakteryjnej, materiał komórkowy z komórek usuwanych w wątrobie) jak i antygeny obce (głównie z układu pokarmowego). Utrzymywanie stanu tolerancji przy jednoczesnej konieczności eliminacji patogenów jest przyczyną przewagi w prawidłowej wątrobie komórek czynnościowo zbliżonych do układu odporności nieswoistej. Zachowanie integralności tego układu wymaga bardzo aktywnych, ściśle kontrolowanych reaktywności regulujących, które mogą ulec zachwianiu pod wpływem wielu czynników o charakterze infekcyjnym lub odczynowym [14].

### **Skład komórkowy i reakcje odpornościowe w wątrobie prawidłowej**

Funkcje metaboliczne i sekrecyjne wątroby zależą od komórek parenchymy (hepatocyty, przewody żółciowe) tj. ok. 70% ogólnego składu komórkowego, a funkcje immunologiczne od komórek nie parenchymalnych, tj. NPC (30% składu). NPC zawiera: komórki endotelium zatok wątrobowych (LSEC – 40%), limfocyty (25%), makrofagi wątrobowe-komórki Kupffera (20%), komórki gwiaździste (HSC – 10%), komórki epitelium dróg żółciowych – BEC-5% [14].

LSEC działają jako biofiltr pomiędzy krwią przepływającą przez zatoki a osoczem w przestrzeniach sub-endotelialnych Dissego (graniczy z hepatocytami) i zawiera komórki gwiaździste, syntetyzujące białka macierzy pozakomórkowej, szczególnie w odpowiedzi na różne mediatory zapalenia, co inicjuje proces włóknienia. LSEC w sposób ciągły syntetyzują wiele cytokin, oraz cząsteczek adhezyjnych: ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) i CD58 (LFA-3), VCAM-1 i ko-stymulacyjnych (HLA-kłasy I i II, CD80, CD86) oraz białka Fas (CD95) i ligandy CD95 L. Ich ekspresja umożliwia: a) selektywne wylapywanie aktywowanych limfocytów T (głównie CD8+), napływających do wątroby po zakończeniu odpowiedzi odpornościowej na czynnik stymulujący; większość z nich ulega apoptozie, b) prezentację egzogennych antygenów limfocytom T (CD4+ i CD8+) bez uprzedniej aktywacji de novo. Kontakt preaktywowanych przez antygen limfocytów z LSEC indukuje tolerancję na ponowny kontakt z antygenem- synteza IL-10 i TGF- $\beta$  [14].

Komórki Kupffera pochodzą z monocytów krwi obwodowej które przechodzą do zatok wątrobowych i różnicują się do „wędrujących” makrofagów, przytwierdzonych do LSEC. Wykazują silne właściwości fagocytarne i cytotoksyczne oraz działają jako komórki prezentujące antygen (APC) limfocytom T. Aktywowane przez czynniki infekcyjne lub/i prozapalne (interferony, cytokiny, hemokiny, toksyny) syntetyzują wiele czynników pro-zapalnych: prostaglandyny, pro-zapalne cytokiny (IL-12, IL-18, IFN-alfa, IL-1, IL-6) reaktywne formy tlenu i azotu, cytokiny przeciw-zapalne (IL-10, IL-13, TGF-beta). Komórki Kupffera i LSEC współdziałają ze sobą,

pełnić szereg funkcji immunologicznych, które generalnie zapewniają protekcję przed czynnikami infekcyjnymi i działają tolerogenicie [14].

Komórki BEC wycielające wewnątrzwątrobowe i zewnątrzwątrobowe przewody żółciowe wpływają na przepływ żółci z wątroby do dwunastnicy; żółć zawiera znaczne ilości immunoglobulin, szczególnie IgA. Komórki BEC syntetyzują chemokiny i cytokiny, wykazują ekspresję szeregu molekuł adhezyjnych i kostymulacyjnych zwłaszcza CD40, co oznacza że mogą działać jak profesjonalne APC (komórki prezentujące antygen).

### Charakterystyka fenotypowa i czynnościowa limfocytów wątroby

Wątroba zawiera ponad 50% komórek NK (10% we krwi), 25% klasycznych limfocytów T, tj z ekspresją receptora TCR $\alpha\beta$  (70% we krwi); ponad 10% limfocytów T z ekspresją receptora TCR $\gamma\delta$  (3% we krwi); 5% B limfocytów (10% we krwi), oraz około 1% pluripotencjalnych komórek macierzystych (praktycznie brak we krwi).

Populacja limfocytów T (TCR  $\alpha\beta$ +) wątroby zawiera: 60% limfocytów T CD8+ (20% we krwi) i 20% limfocytów T CD4+ (40% we krwi obwodowej), oraz 20% tzw komórek TCR-low DN, tj limfocytów T o niskiej ekspresji TCR, bez koreceptorów CD4 i CD8.

Klasyczne komórki NK (CD56+/CD3-) spontanicznie eliminują komórki nowotworowe, oraz komórki zakażone wirusami i bakteriami. Aktywowane (przez IL-12) syntetyzują IFN- $\gamma$  który ułatwia różnicowanie dziewiczych komórek CD4+ w kierunku limfocytów Th1. Limfocyty NK nie posiadają błonowych receptorów specyficznie rozpoznających antygen, lecz wykazują ekspresję szeregu innych receptorów błonowych o konserwatywnej strukturze (receptory naturalnej cytotoksyczności), zdolnych do wiązania się z różnymi strukturami powszechnie występującymi w błonie komórkowej wielu typów komórek. Generacja limfocytów NK w wątrobie zależy od lokalnej syntezy IL-15, a ich dalsza ekspansja od IL-15, IL-18 i IL-2. Cytotoksyczność limfocytów NK wzmagana jest przez wiele cytokin (interferony, IL-12, IL-18, IL-21). Są niezwykle efektywne w syntezie IFN-gamma. Niekontrolowany wzrost ich aktywności powoduje reakcje zapalne w przebiegu infekcji wirusowych oraz reakcji autoagresyjnych [14].

W wątrobie występuje bardzo liczna populacja nietypowych komórek NK (limfocyty NK-T), z ekspresją receptora TCR (o ograniczonym repertuarze swoistości) oraz receptorów CD4 lub CD8. Receptor TCR tych komórek rozpoznaje glikolipidowe składowe błon komórkowych bakterii (fosfolipidy inozytoloze, kwasy mykoloze, etc), prezentowane przez niepolimorficzne cząsteczki CD1a,b,c,d (nieklasyczne MHC-klasy I). Komórki NKT syntetyzują cytokiny Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) oraz Th2 (tj. IL-4), oraz jednocześnie IL-4 i IFN- $\gamma$  (profil Th0). Wykazują silną aktywność cytotoksyczną (bez restrykcji MHC), która wzmagana jest działaniem cytokin Th1 [14].

### Limfocyty T z ekspresją TCR $\gamma\delta$

Limfocyty TCR $\gamma\delta$  stanowią do 35% całkowitej puli komórek T wątroby. Większość z nich wykazuje ekspresję ko-receptora CD8 oraz receptorów typowych dla komórek NK. Rola tych komórek w wątrobie jest mało znana, lecz ich liczna repre-

zentacja potwierdza przewagę wrodzonych, nieswoistych aktywności układu odpornościowego wątroby nad mechanizmami odporności adaptacyjnej. Aktywowane limfocyty TCR $\gamma\delta$  syntetyzują cytokiny typu Th1 i Th2, wykazują silne działanie cytotoksyczne bez restrykcji MHC, uczestniczą w szybkim usuwaniu bakterii, komórek zakażonych wirusami oraz komórek nowotworowych, działają immunosupresyjnie.

### Zaburzenia immunologiczne wątroby związane z NAFLD i zespołem metabolicznym

Większość informacji dotycząca immunologicznych mechanizmów zapalenia wątroby w zespole NAFLD pochodzi z badań na modelach zwierzęcych z wykorzystaniem myszy ob/ob z genetycznym deficytem leptyny (mutacja genu ob/ob), oraz szczurów fa/fa lub myszy db/db, które nie wykazują ekspresji receptora dla leptyny (mutacja receptora). Zwierzęta te spontanicznie rozwijają zespół NAFLD oraz inne cechy zespołu metabolicznego (otyłość, dyslipidemia, hiperglikemia oraz oporność na insulinę). Wykazują też wyjątkowo wysoką wrażliwość na działanie LPS, co manifestuje się silnym działaniem hepato-toksycznym w odpowiedzi na LPS podanym w niskiej dawce, dobrze tolerowanej przez zwierzęta kontrolne [15].

Badania w tym modelu doświadczenia wykazały defekt komórek Kupffera oraz selektywny spadek liczby i aktywności subpopulacji limfocytów NKT-CD4+ [16].

### Defekt komórek Kupffera

Zarówno u myszy ob/ob (deficyt leptyny) jak i u szczurów fa/fa (oporność na leptynę) występują 4 typy defektu komórek Kupffera (KC): a) zmiany w zakresie ekspresji genu *KCR* (typowego dla komórek Kupffera), b) spadek zdolności fagocytarnych *in vivo* i *in vitro*, c) wzrost oksydacyjnej aktywności mitochondriów, d) wzrost ekspresji pro-zapalnych cytokin.

Defekty te występują zarówno bez indukcji z LPS (w mniejszym stopniu) jak i po ekspozycji na LPS (silniej zaznaczone). Dotyczą nie tylko makrofagów wątroby, lecz także makrofagów otrzewnowych, szpiku i śledziony badanych zwierząt. Inkubacja z leptyną makrofagów myszy ob/ob (ekspresja receptora dla leptyny zachowana) niweluje defekt fagocytozy, lecz nie zmienia profilu ekspresji cytokin pro-zapalnych, co oznacza że niektóre zaburzone funkcje komórkowe makrofagów w NAFLD nie zależą od deficytu leptyny [16].

Makrofagi i monocyty są komórkami docelowymi dla LPS poprzez układ receptorów Toll-4/CD14. Makrofagi wątroby są bardzo liczne (5% ogólnego składu komórkowego wątroby, 90% puli ustrojowej). LPS jest silnym induktorem tych komórek, a czynnikiem efektorowym, indukującym reakcje cytotoksyczne wobec hepatocytów jest TNF-alfa. Cytokiny, tj. IL-12, IL-18, IFN-gamma zwiększają efektywność LPS, natomiast czynniki hamujące (IL-10, IL-13, TGF-beta, adiponektyna) mają działanie protekcyjne [16].

Niektóre cechy makrofagów wątroby lub jamy otrzewnej szczurów fa/fa lub myszy ob/ob (spadek ekspresji genu *KCR*, pro-zapalny profil cytokinowy) są podobne jak u zwierząt którym podano LPS. Wysoka aktywność układu oksydacyjnego mitochondriów w makrofagach myszy ob/ob związana jest ze spadkiem ekspresji niektórych regulatorowych białek



mitochondrialnych, kontrolujących poziom oksydacji. Efekt ten obserwuje się zarówno przed jak i po indukcji komórek z LPS. Produkty oksydacji (nadtlenek wodoru) wzmagają ekspresję szeregu komórkowych czynników transkrypcyjnych dla mediatorów zapalenia (IL-6, cyklooksygenaza-1), które powodują wzrost produkcji PGE-2. Wzrost ekspresji prostanoïdów wzmaga syntezę białek anty-apoptotycznych rodziny bcl-2 przez hepatocyty. Inne produkty makrofagów (nadlenek wodoru, tlenek azotu, cytokiny pro-zapalne) działają uszkadzająco. TNF-alfa wzmaga ekspresję białek mitochondrialnych blokujących poziom produkcji ATP co przyczynia się do spadku syntezy ATP i zwiększania podatności hepatocytów na działanie czynników nekrotycznych [16].

Stres oksydacyjny jest też jedną z przyczyn indukowania pro-zapalnego profilu ekspresji cytokin przez makrofagi wątroby. Ma to znaczenie nie tylko efektorowe, lecz przede wszystkim regulacyjne, ponieważ wpływa na profil cytokin regulujących wzrost i aktywność różnych typów limfocytów wątroby. Najważniejsze z nich to IL-15, IL-12 oraz IL-18. IL-15 wzmaga proliferację i różnicowanie różnych typów limfocytów NK w wątrobie, w tym komórek CD4(+) NK1.1 T (produkują przeciw-zapalne cytokiny IL-10, IL-4, IL-13), oraz wzmaga proliferację cytotoksycznych limfocytów T CD8+. Cytokiny IL-18 i IL-12 również wpływają na różnicowanie różnych typów limfocytów NK, lecz ich działanie przyczynia się do masywnej syntezy IFN-gamma [16].

Wzrost lub zmniejszanie się liczebności oraz zmiany czynnościowe aktywności różnych subpopulacji limfocytów wątroby mają kluczowe znaczenie dla utrzymywania oporności na toksyczne działania LPS i innych czynników różnego pochodzenia.

Czynnikiem decydującym o nadwrażliwości komórkowej na LPS jest stymulacja makrofagów przez IL-12 oraz IL-18 lub IFN-gamma. Powoduje to wzrost ekspresji receptorów komórkowych dla LPS (Toll-4R) oraz wzrost transkrypcji genów cytokin pro-zapalnych (głównie TNF-alfa i innych). Ponowny kontakt z LPS powoduje gwałtowny wzrost produkcji TNF-alfa i innych cytokin pro-zapalnych. Ten typ odpowiedzi na LPS (reakcja Shwartzmana) zachodzi w wielu reakcjach odpornościowych z udziałem monocytów lub makrofagów. Zakres reakcji jest kontrolowany przez cytokiny przeciw-zapalne (IL-4, IL-10, etc) działających głównie poprzez inaktywację makrofagów [17].

### Spadek liczby i aktywności regulacyjnych limfocytów CD4(+) NKT w NAFLD

Nadmiar pro-zapalnych cytokin wywołuje nie tylko efekty pro-zapalne, lecz także zmniejsza populację komórek regulacyjnych wątroby, produkujących cytokiny przeciw-zapalne. W modelu badania z użyciem *Propionibacterium acnes* czynnik bakteryjny stymuluje makrofagi wątroby normalnych myszy do produkcji IL-12 oraz IL-18, co powoduje ich nadwrażliwość na działanie LPS. Cytokiny te (zwłaszcza IL-12) selektywnie zmniejszają liczebność populacji regulacyjnych limfocytów CD4(+) NKT (apoptoza), a komórki przeżywające produkują mniej cytokin przeciw-zapalnych [18].

U myszy ob/ob populacja regulacyjnych limfocytów CD4(+) NKT jest niska. Po zakażeniu *Propionibacterium acnes* i re-stymulacji LPS obniża się znacznie bardziej niż u zwierząt kontrolnych z powodu wysokiej apoptozy. Profil reaktywności

komórkowej po indukcji LPS jest spolaryzowany w kierunku silnie pro-zapalnym (typ Th1). Efekt ten jest niezależny od leptyny, ponieważ selektywny spadek populacji CD4(+) NKT zachodzi u myszy normalnych, z otyłością pokarmową oraz u myszy z opornością na leptynę.

Reaktywności pro-zapalne wątroby zależą nie tylko od cytokin produkowanych przez makrofagi, lecz także przez inne komórki rezydujące w wątrobie. Komórki gwiaździste (HSC) produkują szereg cytokin istotnych w procesie włóknienia (TGF-beta), a także angiotensynogen, norepinefrynę, leptynę i adiponektynę. Cholangiocyty i hepatocyty produkują IL-6, TNF-alfa i inne cytokiny. Akumulacja lipidów w hepatocytach wzmaga ekspresję czynnika transkrypcyjnego NFκB dla TNF-alfa, a ekspresja IL-6 powoduje IS w mięśniach u myszy (odwracaną przez przeciwciała anti-IL-6), co wskazuje na związek pomiędzy poziomem ekspresji cytokin w hepatocytach a rozwojem obwodowej IS [19,20].

### Nadwrażliwość limfocytów chemotaktycznych na działanie chemokin

Czynniki chemotaktyczne wątroby, tj. czynnik chemotaktyczny limfocytów B (BCA-1) oraz zrębowy czynnik chemotaktyczny (SDF-1alfa) indukują migrację odpowiednio limfocytów B oraz T CD4+, T CD8+, NK, NK-T. Limfocyty obwodowe myszy ob/ob wykazują nadwrażliwość na działanie tych czynników *in vivo* i *in vitro*. Podanie antybiotyków zmniejsza infiltrację wątroby przez obwodowe limfocyty. LPS nasila ten proces. Wzrost wrażliwości limfocytów na działanie czynników chemotaktycznych w przebiegu NAFLD jest ich integralną cechą ponieważ przeniesione do myszy zdrowych także silnie migrują do wątroby [20].

### Patogeneza różnych form zapalenia w NAFLD

#### Progresja NAFLD w kierunku NASH

Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że progresja NAFLD w początkowych stadiach choroby zależy od nie zbalansowanego poziomu pro i przeciw-zapalnych mediatorów zapalenia, pochodzących z tkanki tłuszczowej tj. przede wszystkim TNF-alfa oraz adiponektyny [21].

Myszy ob/ob wykazują wzrost poziomu TNF-alfa w surowicy a spadek adiponektyny. Podanie adiponektyny łagodzi zarówno symptomy zespołu metabolicznego (hiperglikemię, IR) jak i zapalenie wątroby (zmniejszanie stłuszczenia, spadek transaminaz) oraz zapalenia systemowego (spadek TNF-alfa). Podobne wyniki uzyskano na modelu myszy KK Ay, które spontanicznie rozwijają otyłość, IS, oraz wzrost TNF-alfa i zapalenie wątroby. Badania te wskazują, że indukowany adiponektyną spadek poziomu TNF-alfa hamuje progresję NAFLD [22].

Inaktywacja TNF-alfa przez przeciwciała neutralizujące łagodzi przebieg NASH u myszy ob/ob oraz NAFLD u myszy z otyłością pokarmową [23]. Delecja genu TNFR1 chroni myszy z otyłością pokarmową przed progresją NAFLD-NASH, pomimo wysokiej IS oraz hyperleptynemii [24].

Badania te wskazują, że stosunek ilościowy TNF-alfa/adiponektyna w surowicy jest wysoki w różnych modelach NASH, oraz że przebieg NASH ulega złagodzeniu poprzez norma-

lizację TNF/adiponektyna albo wzrost poziomu adiponektyny lub inaktywację TNF-alfa.

Wyniki te pokrywają się z danymi uzyskanymi u ludzi. Analiza wyników zmian poziomu adiponektyny i TNF-alfa wskazuje, że ryzyko NASH (w porównaniu do NAFLD) wzrasta wraz ze spadkiem poziomu adiponektyny i wzrostem TNF-alfa (6-krotny wzrost ryzyka wraz ze spadkiem poziomu adiponektyny o 5 µg/ml i 2-krotny wzrost wraz ze zwiększeniem TNF-alfa o 1 µg/ml [25]. W wątrobie pacjentów z NASH ekspresja adiponektyny i receptora dla adiponektyny jest niższa aniżeli u pacjentów z SH [26]. Zmniejszanie masy tkanki tłuszczowej oraz leczenie (metformina, tiazolidendiony) zmniejsza poziom TNF a zwiększa adiponektyny [27]. Złagodzenie NASH uzyskano też po podaniu pentoksyfiliiny, antagonisty TNF-alfa [28].

### Progresja NASH w kierunku zwłóknienia i marskości.

Dalsza progresja NASH także zależy od zmian aktywności metabolicznej tkanki tłuszczowej w przebiegu NAFLD. Wspomniane w pracy czynniki pro-zapalne silnie indukują tkankę tłuszczową. Wiele jej produktów (leptyna, TGF-beta, angiotensynogen, PAI-1) ma działania pro-fibrotyczne [29]. TNF-alfa silnie indukuje ich produkcję w tkance tłuszczowej, hamuje natomiast działanie adiponektyny [30]. Wskazuje to na ewentualny udział tych czynników w patogenezie zwłóknienia, jednak nie wyjaśnia dlaczego zwłóknienie jest stosunkowo rzadkie u osób z rozrostem tkanki tłuszczowej trzewnej i zespołem metabolicznym, pomimo systemowej, przewlekłej reakcji pro-zapalnej.

U myszy ob/ob (deficyt leptyny) oraz szczurów fa/fa i myszy db/db (oporność na leptynę) nie rozwija się zwłóknienie wątroby pomimo cech zespołu metabolicznego. Podanie leptyny wyrównuje jej niedobór u myszy ob/ob oraz normalizuje fibrotyczną reaktywność wątroby na różne egzogenne hepatotoksyny. Eliminuje także NASH u tych zwierząt [30]. Zapalenie wątroby *per se* nie jest więc czynnikiem wystarczającym dla rozwoju zwłóknienia/marskości. Leptyna w pewnych okolicznościach może działać przeciw-zapalnie

(indukuje IL-10 i antagonistę receptora dla IL-1 (IL-1RA) makrofagów [31]. Należy jednak podkreślić, że większość pacjentów z NAFLD i otyłością jest przynajmniej częściowo oporna na leptynę. Obserwacje te pokrywają się z danymi klinicznymi: a) zwłóknienie/marskość nie zawsze występuje u pacjentów z NASH nawet po wielu latach trwania choroby, b) stłuszczenie proste (SH) często znika już w okresie utrwałonej marskości [32].

Czynniki pro-zapalne indukujące NASH są więc odrębne od tych, które są konieczne dla indukcji zwłóknienia/marskości. Ich produkcja zależy od generowania określonego typu komórek w wątrobie w przebiegu NAFLD. Najważniejsze z nich to regulacyjne limfocyty CD4(+) NKT. Komórki te produkują cytokiny o silnych właściwościach pro-fibrotycznych, tj. IL-4, IL-13 [33]. Indukują one ekspresję kolagenu w komórkach gwiaździstych wątroby [34] oraz fibroblastach [35]. Prawdopodobnie wiele mediatorów zapalenia zaangażowanych jest w proces zwłóknienia/marskości w przebiegu NAFLD. Jednym z ważniejszych jest IL-13. Myszy z delecją genu tej cytokiny nie rozwijają marskości wątroby pomimo ekspresji TGF-beta i innych mediatorów zwłóknienia [36]. Pozostaje zagadką w jaki sposób cytokina ta wpływa na produkcję i reaktywność innych czynników pro i anti-fibrotycznych w NAFLD.

NAFLD jest czynnikiem ryzyka hepatocellular carcinoma (HC). HC rozpoznawany jest w stanach marskości wątroby. Proces nowotworowy może rozpoczynać się znacznie wcześniej, prawdopodobnie już na etapie stłuszczenia prostego. Stłuszczenie związane jest ze znacznym wzrostem populacji komórek progenitorowych wątroby [37]. W modelach zwierzęcych z użyciem karcinogenów szybkość wzrostu liczebności tych komórek koreluje z pojawianiem się komórek nowotworowych [38]. W NAFLD i innych chorobach wątroby ich populacja wzrasta wraz z progresją zwłóknienia do marskości [39]. Komórki progenitorowe wątroby z transformacją nowotworową są rozpoznawane przez silnie cytotoksyczny układ komórkowy wątroby (szczególnie makrofagi, komórki NK różnych typów) i eliminowane. Chroniczne zapalenie może jednak zaburzać ten proces [40].

### Piśmiennictwo:

1. Westerbacka J, Kolak M, Kiliviluoto T i wsp: Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 2007; 56: 2759-65
2. Grieco A, Forgione A, Miele L i wsp: Fatty liver and drugs. *Eur Rev Med Farmacol Sci*, 2005; 9: 261-63
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: The metabolic syndrome - a new world wide definition. *Lancet*, 2005; 366: 1059-62
4. Choi S, Diehl AM: Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005; 21: 702-7
5. Fruhbeck G, Nutr RSalvador J: Role of adipocytokines in metabolism and disease. *Nutrition Research*, 2004; 24: 803-26
6. Berg AH, Scherer PE: Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 2005; 96: 939-49
7. Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115: 911-19
8. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A: Adipose tissue as an ancestral immune organ: site specific change in obesity. *FEBS Lett*, 2005; 579: 3487-92
9. Utschneider K, Kahn SE: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91: 4753-61
10. Bauman H, Gauldie J: The acute phase response. *Immunology Today*, 1994; 15: 74-80
11. O'Riordain MG, Ross JA, Fearon KC: Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. *Am J Physiol*, 1995; 269(2 Pt 1): 323-30
12. Aderka D, Engelmann H, Maor Y i wsp: Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*, 1992; 175: 323-29
13. Shoelson SE, Lee J, Goldfine A: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006; 116: 1793-801
14. Mackay I: Hepatoimmunology from horizon to harborside. In: Gershwin ME, Vierling JM, Manns MD (eds.), *Liver Immunology*, Hanley&Belfus, Inc/Philadelphia, 2003; 15-29
15. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD i wsp: Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications to pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci*, 1977; 94: 2557-62
16. Diehl AM: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002; 282: G1-G5
17. Motegi A, Kinoshita M, Sato K i wsp: An *in vitro* Shwartzman reaction-like response is augmented age-dependently in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leuc Biol*, 2006; 79: 463-72



18. Guebre-Xabier M, Yang S, Zhi Lin H i wsp: Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology*, 2000; 31: 633-640
19. Potter JJ, Womack L, Mozey E, Anania FA: Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998;244: 178-182
20. Bigome AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S i wsp: Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of fatty liver inflammation in obese mice. *Gasroenterology*, 2008; 134: 1459-69
21. Xu AW, Keshaw H: The fat derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*, 2003; 112: 91-100
22. Mazaki T, Chiba S, Tatsukawa H: Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- $\alpha$  in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, 2004; 40: 177-84
23. Li Z, Yang S: Probiotics and antibodies to TNF- $\alpha$  inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2003; 37: 343-50
24. Feldstein AE, Weinberg NW, Canbay A: Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via lysosomal pathway. *Hepatology*, 2004; 40: 185-94
25. Hui JM, Hodge A, Farrel GC: Beyond insulin resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology*, 2004; 40: 46-54
26. Kaser S, Moschen A, Cayon A: Adiponectin and its receptors in nonalcoholic steatohepatitis. *Gut*, 2005; 54: 117-21
27. Kopp HP, Krzyżanowska K, Mohlig M: Effects of market weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation on insulin resistance in morbidly obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2005; 29: 766-71
28. Lafontain M: Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2005; 45: 119-46
29. Koteish A, Diehl AM: Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis*, 2001; 21: 89-104
30. Matteoni CA, Yonossi ZM, Gramlich T: Nonalcoholic liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999; 116: 1413-19
31. Gabay C, Dreyer BMG, Pellegrinelli N i wsp: Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 783-91
32. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R: The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow study of 42 patients for up to 21 years. *Hepatology*, 1990; 11: 74-80
33. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L: Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol*, 2004; 173: 1417-25
34. Sugimoto R, Enjoji M, Nakamura M: Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured L190 human hepatic stellate cells. *Liver Int*, 2005; 25: 420-28
35. Ingram JL, Rice A, Geisenhofer K: Interleukin-13 stimulates the proliferation of lung myofibroblasts via a signal transducer and activator of transcription -6 dependent mechanism: a possible mechanism of the development of airway fibrosis in asthma. *Chest*, 2003; 123: 422-24
36. Kaviratne M, Hesse M, Leusink M: IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- $\beta$  independent. *J Immunol*, 2004; 173: 4020-29
37. Yang S, Linz HZ, Hwang J: Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? *Cancer Res*, 2001; 61: 5016-23
38. Sell S: Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell Dev Biol*, 2002; 13: 419-24
39. Roskmas T, Yang SQ, Koteish A: Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol*, 2003; 163: 1301-11
40. Chen GG, Lau WY, Lai PB: Activation of Kupffer cells inhibits tumor growth in a murine model system. *Int J Cancer*, 2002; 99: 713-20