

# Odczyny autoimmunologiczne wśród chorych z alkoholowym uszkodzeniem wątroby

## Autoimmune reactions in patients with alcoholic liver disease

**Tomasz Szulżyk, Anna Parfieniuk-Kowerda, Tadeusz Wojciech Łapiński, Robert Flisiak**

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Białystok, Polska

**Summary:** 4.6% of the world's population die each year from alcohol dependence. Activation of the immune system in the course of alcoholic liver disease plays an important role in the pathogenesis of the disease. Understanding this mechanism could create new treatment options, alternative to liver transplantation.

Occurring in the course of alcoholism oxidative stress stimulates the synthesis of Malonyldialdehyd (MDA). MDA can react with deoxyguanosine and deoxyadenosine inducing DNA mutations. Acetaldehyde and MDA stimulate synthesis in cells syngeneic protein, against which specific antibodies are formed. Currently it is believed that the relationship of malondialdehyde and acetaldehyde (MAA) plays a key role in the formation of syngeneic proteins in the liver, is a stimulator of the synthesis of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-2, adhesion molecules ICAM, P-selectin, L-selectin, T cells and stimulates fibrosis in the liver.

**Słowa kluczowe:** alkoholowe uszkodzenie wątroby • aktywacja układu immunologicznego

**Key words:** alcoholic liver damage • immune activation

**Adres do korespondencji:** Tadeusz Wojciech Łapiński, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok, Polska, e-mail: twlapinski@wp.pl

### Wstęp

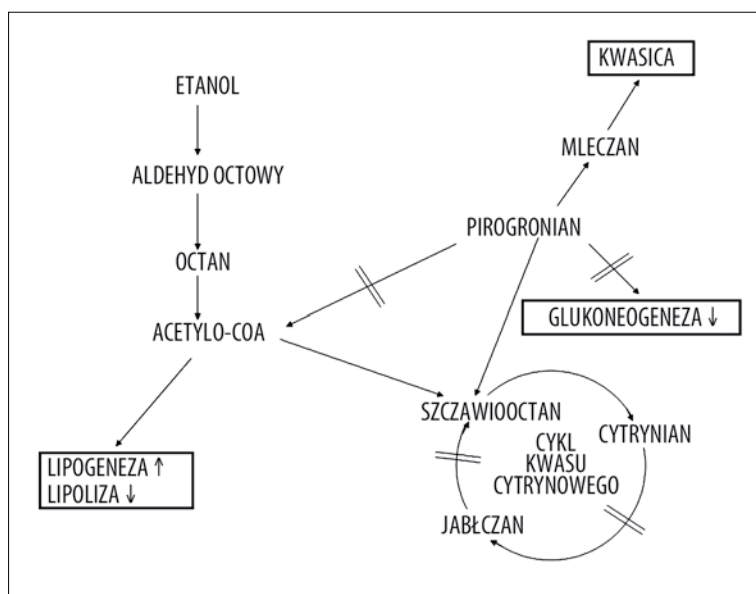
Alkoholizm jest obecnie jednym z najpoważniejszych problemów społecznych i zdrowotnych. Szacuje się, że z powodu uzależnienia od alkoholu umiera rocznie 4,6% ludności na świecie. Aktualne badania wskazują, że w tej grupie osób na drodze różnych procesów metabolicznych, może dochodzić do aktywacji układu immunologicznego odgrywającego ważny element w patologii choroby. Dokładniejsze poznanie tych mechanizmów może stworzyć możliwości lecznicze, będące alternatywą dla transplantacji wątroby.

Rozwój stanu zapalnego, włóknienia i marskości wątroby w przebiegu toksycznego uszkodzenia etanolem zależy od pobudzenia komórek Browicza-Kupffera, wzrostu syntezy IL-8 i TNF- $\alpha$ , aktywacji komórek Ito do syntezy kolagenu, zaburzeń metabolizmu hepatocytów w odniesieniu do stresu oksydacyjnego, redukcyjnego oraz pobudzeniu reakcji toksycznych związanych z powstawaniem pośrednich produktów utleniania alkoholu.

### Rola cytokin w alkoholowym uszkodzeniu wątroby

Przewlekłe spożywanie etanolu doprowadza do zmian składu mikroflory jelitowej ze wzrostem ilości bakterii Gram ujemnych, których składnikiem ściany komórkowej jest lipopolisacharyd (LPS). Ponadto, u takich chorych obserwuje się osłabienie bariery ochronnej jelita cienkiego i przenikania endotoksyn do krążenia wrotnego [1]. Lipopolisacharyd powoduje pobudzenie metabolizmu i aktywacji komórek Kupffera. Efektem jest wzrost syntezy cytokin prozapalnych, głównie czynnika TNF- $\alpha$  oraz wolnych rodników tlenowych. W krwiobiegu alkoholików i u zwierząt doświadczalnych, które były poddane działaniu etanolu stwierdzono wzrost poziomu endotoksyny bakteryjnej [2,3]. Badania wykazały, że stosowanie antybiotyków, na które są wrażliwe bakterie jelitowe powoduje zmniejszenie aktywności procesu zapalnego w wątrobie [4].

Receptory TLRs, a zwłaszcza TLR4, odpowiadają prawdopodobnie za transmisję sygnału LPS z receptora CD14 do



**Rycina 1.** Procesy utleniania alkoholu i ich wpływ na cykl cytrynianowy.

komórki [5]. Blokowanie receptorów CD14 lub TLR u myszy powoduje zniesienie toksycznego działania etanolu [6]. Wykazano, że u samic szczurów komórki Kupffera są bardziej wrażliwe na LPS, niż u samców. Komórki Kupffera samic syntetyzują więcej czynnika TNF- $\alpha$ , co sugeruje, że są bardziej wrażliwe na działanie etanolu. Dodatkowo ekspresja CD14 jest większa w komórkach Kupffera izolowanych od samic [7]. U osób z alkoholowym zapaleniem wątroby stężenie CD14 jest wyższe w porównaniu do osób nie spożywających alkoholu [8]. Również stężenie czynnika martwicy nowotworu TNF- $\alpha$  wzrasta we krwi alkoholików eksponowanych na etanol [9]. Na hepatotoksyczne działanie czynnika TNF- $\alpha$  wskazuje fakt braku uszkodzenia wątroby u myszy, którym podawano alkohol i jednocześnie blokowano aktywność TNF- $\alpha$  [10]. Stosowanie przeciwciał dla czynnika TNF- $\alpha$  (np. Infliximab) u ludzi z ostrym alkoholowym zapaleniem wątroby dawało zmienne efekty [11,12]. Całkowite zablokowanie tego czynnika zmniejsza zdolności reakcji obronnej organizmu w odpowiedzi na patogeny [13,14]. TNF- $\alpha$  jest czynnikiem nie tylko wpływającym negatywnie na hepatocyty, ale również bierze udział w regeneracji komórek wątroby. Zablockowanie receptorów TNF- $\alpha$  u myszy zmniejsza proliferację hepatocytów [15]. Stąd też, szukając nowych metod terapeutycznych powinno się dążyć raczej do normalizowania poziomu TNF- $\alpha$ , niż jego zablokowania.

Metabolizm alkoholu zależy od tlenu, katalizowany jest przez dehydrogenazę alkoholową, dehydrogenazę aldehydową, cytochrom P450 oraz katalazę. W przypadku przemian zależnych od dehydrogenazy alkoholowej, powstającym produktem jest aldehyd octowy (AA). Aldehyd ten jest substancją toksyczną i mutageną. Ma on istotne znaczenie w procesach syntezy i naprawy DNA, a ponadto stymuluje mutacje punktowe w niektórych genach. Aldehyd octowy wiąże się z białkami komórkowymi i DNA powodując morfologiczne uszkodzenia komórek, jak i zapoczątkowanie reakcji immunologicznych w tym autoimmunologicznych. Związek ten ulega przekształceniu w octan lub acetylo-CoA. Procesy utleniania alkoholu związane z przemianą pirogronianu do mleczanu, powodują kwasicę i hipoglikemię, natomiast przemiany szczawianu do jabłczanu działają supresyjnie na aktywność cyklu kwasu cytrynianowego i glukogenezy oraz wzmagają syntezę kwasów tłuszczowych (Rycina 1). Alkohol

zwiększa stężenie  $\alpha$ -glicerofosforanu co nasila syntezę triglicerydów [16].

Występujący w przebiegu alkoholizmu stres oksydacyjny aktywuje transkrypcję genów związanych z procesem zapalnym i apoptozą, a ponadto prowadzi do degradacji wielonienasyconych tłuszczów w wyniku czego powstaje malonyldialdehyd [17]. Związek ten jest bardzo aktywny i łatwo wchodzi w powiązania z białkami. Malonyldialdehyd (MDA) może wchodzić w reakcje z deoksyadenozyną i deoksyguanozyną indukując powstawanie DNA mutacji. Wpływ aldehydu octowego oraz malonyldialdehydu na komórkę, może zaowocować powstaniem białek syngenicznych wobec których powstają specyficzne przeciwciała. Różnice pomiędzy białkami syngenicznymi, a własnymi są tak niewielkie (wysoka zgodność immunologiczna), że wystąpienie reakcji autoimmunologicznych jest całkowicie zrozumiałe. Aktualnie uważa się, że związek malonyldialdehydu z aldehydem octowym (MAA) odgrywa kluczową rolę w powstawaniu białek syngenicznych w wątrobie. MAA wpływa nie tylko na powstawanie białek syngenicznych, jest stymulatorem cytokin pro-zapalnych IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-2, molekuł adhezyjnych ICAM, P-selektyny, L-selektyny, pobudza limfocyty T oraz stymuluje włóknienie, poprzez wzmożoną syntezę kolagenu i fibronektyny [18].

Stłuszczenie wątroby jest zazwyczaj początkowym i najczęstszym następstwem nadużywania alkoholu. Gromadzące się w hepatocytach kuleczki tłuszczu łączą się prowadząc do degeneracji komórki i jej rozpadu. Dalszym etapem uszkodzenia wątroby jest dołączenie stanu zapalnego wokół hepatocytów z istniejącymi zmianami wielkopęcherzykowymi. W części hepatocytów, w których nie stwierdza się obecności kropli tłuszczu dochodzi do zwyrodnienia szklisteo. Charakteryzuje się ono obrzękiem, zmiennym kształtem jądra oraz pojawieniem się w cytoplazmie fibrylarnych białek (wtrety). Istotne zmiany dotyczą nie tylko hepatocytów, ale również przestrzeni międzykomórkowej. W macierzy międzykomórkowej dochodzi do rozrostu tkanki łącznej z układaniem się włókien kolagenowych wokół zatok i hepatocytów oraz ich wnikaniem do przestrzeni Dissego. Syntezę włókien kolagenowych stymuluje niedotlenienie i martwica hepatocytów. Stłuszczenie wątroby jest początkowym



etapem alkoholowego uszkodzenia wątroby. W zmienionej wątrobie dochodzi również do stwardnienia dystalnych części naczyń krwionośnych.

### **Immunogenność metabolitów przemian etanolu**

Już w latach dziewięćdziesiątych opisywano występowanie reakcji autoimmunologicznych u osób nadużywających alkoholu. Uważano, że procesy te mogą być jedną z przyczyn uszkodzenia wątroby związanego z nadużywaniem alkoholu [19].

Wśród osób stale i długotrwale nadużywających etanol stężenie aldehydu octowego, jak i malonyldialdehydu jest znacznie wyższe niż wśród osób okresowo spożywających alkohol. Wysokie stężenie tych związków jak też możliwość niewielkich, syngenicznych zmian w ich budowie może stymulować układ immunologiczny do syntezy specyficznych przeciwciał. Badania przeprowadzone przez Viitala i wsp. [20] wykazały występowanie autoprzeciwciał przeciwko AA u 73%, a przeciwko MDA u 76% chorych przewlekłe nadużywających alkoholu. Wydaje się, że powstające przeciwciała przeciwko aldehydowi octowemu jak i malonyldialdehydowi nie są tak niebezpieczne jak przeciwciała mogące powstawać w odpowiedzi na syntetyzowane proteiny, które uległy uszkodzeniu przez wymienione toksyny [21].

W badaniach doświadczalnych Thiele i wsp. [22] wykorzystali MAA jako związek stymulujący rozwój autoimmunologicznego uszkodzenia wątroby. Preparat podawano dootrzewnowo myszom przez okres 3 tygodni. Oprócz wzrostu aktywności ALT, u zwierząt powstały przeciwciała przeciwko białkom cytoplazmatycznym hepatocytów, a w badaniu histopatologicznym wątroby pojawiły się zmiany zapalne z cechami odczynu autoimmunologicznego. Występowanie wszystkich tych zmian, a szczególnie autoprzeciwciał, korelowało z czasem

podawania MAA zwierzętom. Wykazano również korelację pomiędzy pojawieniem się autoprzeciwciał, a stężeniem cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  w tkance wątrobowej po stymulacji MAA. Wprawdzie korelacja ta mogła być zależna od bezpośredniego wpływu MAA na syntezę cytokin prozapalnych, jednak wiadomym jest, że cytokiny prozapalne aktywują układ immunologiczny [23].

Lytton i wsp. [24] wykazali częste (20–30%) występowanie autoprzeciwciał przeciwko cytochromowi P-450, CYP2E1 i CYP3A4 wśród chorych nadużywających alkoholu. Jest to bardzo niebezpieczne, ponieważ autoprzeciwciała, uszkadzając cytochrom P-450 utrudniają, a być może wręcz uniemożliwiają przebieg prawidłowych procesów detoksykacyjnych w wątrobie, w tym przemian wielu leków.

### **Podsumowanie**

Przedstawione wyniki badań wskazują, że nasza dotychczasowa wiedza, w której podstawą był uznawany bezpośredni toksyczny wpływ metabolitów przemian alkoholu na uszkodzenie wątroby jest niepełna. Nowe kierunki badań uwzględniające rolę specyficznych receptorów komórkowych, ich aktywację przez powstające metabolity etanolu, wzrost syntezy cytokin, głównie prozapalnych, wskazują na prawdopodobną, kolejną drogę prowadzącą do uszkodzenia wątroby. Niezwykle interesujące badania nad rolą malonyldialdehydu oraz aldehydu octowego w stymulacji powstawania białek syngenicznych, procesów autoimmunologicznych oraz bezpośrednią indukcją mutacji w DNA komórkowym stanowią jeszcze jeden nowy i istotny proces patologiczny odpowiedzialny za uszkodzenia w wątrobie alkoholików. Aktualnie prowadzone wielokierunkowe badania nad wpływem etanolu na rozwój choroby alkoholowej są nowym i nowoczesnym rozdziałem wiedzy dotyczącej patologii tej choroby.

### **Piśmiennictwo:**

1. Thurman RG: Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*, 1998; 275: G605–11
2. Fukui H, Brauner B, Bode JC i wsp.: Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol*, 1991; 12(2): 162–69
3. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB i wsp.: Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol*, 2009; 50(3): 538–47
4. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU i wsp.: Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterol*, 1995; 108(1): 218–24
5. Schumann RR, Zweigner J. A novel acute - phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clin Chem Lab Med*, 1999; 37: 271–74
6. Triantafyllou M, Triantafyllou K: Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS - activation cluster. *Trends Immunol*, 2002; 23: 301–4
7. Wheeler MD, Kono H, Yin M i wsp.: The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med*, 2001; 31: 1544–49
8. Yin M, Ikejima K, Wheeler MD i wsp.: Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model. *Hepatol*, 2000; 31: 117–23
9. Schafer C, Parlesak A, Schutt C i wsp.: Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxaemia in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol*, 2002; 37: 81–86
10. McClain CJ, Cohen DA: Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatol*, 1989; 9: 349–51
11. Yin M, Wheeler MD, Kono H i wsp.: Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterol*, 1999; 117: 942–52
12. Tilg H, Jalan R, Kaser A i wsp.: Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol*, 2003; 38: 419–25
13. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S i wsp.: A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatol*, 2004; 39: 1390–97
14. Keane J, Gershon S, Wise RP i wsp.: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 2001; 345: 1098–104
15. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ i wsp.: Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 1997; 94: 1441–46
16. Orywal K, Jelski W, Szmitkowski M: Udział alkoholu etylowego w powstawaniu zaburzeń metabolizmu węglowodanów. *Pol Merk Lek*, 2009; 157: 68–71
17. Vidali M, Stewart SF, Albano E: Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury. *Trends Mol Med*, 2008; 14(2): 63–71
18. Duryee MJ, Klassen LW, Thiele GM: Immunological response in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*, 2007; 13(37): 4938–46
19. Laskin CA, Vidins E, Blendis LM i wsp.: Autoantibodies in alcoholic liver disease. *Am J Med*, 1990; 89(2): 129–33
20. Viitala K, Makkonen K, Israel Y i wsp.: Autoimmune Responses Against Oxidant Stress and Acetaldehyde-Derived Epitopes in Human Alcohol Consumers. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24(7): 1103–9

21. Duryee MJ, Willis MS, Freeman TL i wsp.: Mechanisms of alcohol liver damage: aldehydes, scavenger receptors, and autoimmunity. *Front Biosci*, 2004; 9: 3145–55
22. Thiele GF, Duryee MJ, Willis MS i wsp.: Autoimmune Hepatitis Induced by Syngeneic Liver Cytosolic Proteins Biotransformed by Alcohol Metabolites. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010; 12: 2126–36
23. Albano E: Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32(2): 110–14
24. Lytton SD, Helander A, Zhang-Gouillon Z i wsp.: Autoantibodies against Cytochromes P-4502E1 and P-4503A in Alcoholics. *Mol Pharmacol*, 1999; 55: 223–33

