



THE ROLE OF THE LIVER IN XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION.

PART I. THE ROLE OF THE LIVER AND ITS CELLS AND THEIR INTERACTIONS*

Marcin KAMIŃSKI, Ryszard WIADERKIEWICZ

Chair of Morphology, Silesian Medical University, Katowice, Poland

Abstract

The liver is the largest exocrine gland of the human body, which also plays the crucial role in biotransformation and detoxification of many both endogenous and exogenous compounds. In the presented article we describe the general organisation of this organ, as well as the structure and function of both parenchymal (hepatocytes) and nonparenchymal (Kupffer, stellate, endothelial, pit) liver cells. The activity of liver cells changes in response to substances and factors contained in blood that flows through the sinusoids. The intimate contacts and interactions between the above cell types help them to respond to the constantly changing environment in an organised manner and ensure proper function and homeostasis of the liver.

Key words

Liver; Hepatocytes; Nonparenchymal cells.

Received 21 December 2007; accepted 31 December 2007

1. Introduction

The liver is the largest exocrine gland, which also secretes hormones – somatomedin, erythropoietin, components of the RAA system and vitamin D. Its mass, which in an adult male amounts to approximately 1500–1800 g, corresponds to 1/36–1/50 of the total body mass. The organ is enveloped by Glisson's capsule, which enters into the liver along with vessels and nerves. The major part of the liver is covered by the peritoneum. The hepatic parenchyma is divided into four lobes: two large ones – left and right, and two small ones – caudate and quadrate. The phrenic sur-

face is domed and smooth. The visceral surface, however, has a diversified relief, resulting from impressions made by neighbouring organs. Here we also find the hilus of the liver, through which the hepatic artery, portal vein and nerves enter the organ, while the common bile duct and some lymphatic vessels depart.

The gland is composed of hepatocytes and nonparenchymal cells (NPC) situated on the delicate, connective tissue liver stroma. The number of hepatocytes is estimated at 300 billion and they are grouped into 500,000 anatomical lobules.

NPC cells include endothelial, stellate (Ito), Kupffer and pit cells, which together constitute a non-homogenous population of intrahepatic lymphocytes [19]. The liver is also composed of a small population (1–3%) of ovalocytes – a heterogeneous group

* The paper was presented at the inaugural session of the XXIV Conference of Forensic Toxicologists, Wisla, 16–18 May, 2006.

of stem cells situated in the hepatic niche surrounding the Hering ductules [3, 20, 21].

The hepatocytes produce trabeculae, closely associated with blood vessels and bile canaliculi. Opinions concerning interrelations between the hepatic trabeculae, functional circulation, nutritional circulation and bile tract have evolved over time, leading to the differentiation of successive (separate) organisational units, and subsequently structural and functional ones. Thus, anatomical (classic) lobules have been distinguished, as well as portal lobules, simple and complex liver acini, and acinar aggregates. Finally, a micro-circulatory unit has been proposed; it is composed of a variable number of hepatocytes and NPC cells, which are associated not only with respect to circulation, but also linked functionally by local paracrine and autocrine activity [1, 10].

The metabolic potential of the liver is astonishingly vast, encompassing the synthesis and excretion of bile, production of albumins, and globulins and proteins participating in blood coagulation processes, synthesis of some amino acids, oxidative deamination, transamination and urea synthesis. The production of metal-binding proteins – metallothioneins, transferrins, ceruloplasmin, acute phase proteins and α -fetoprotein occurs here. The hepatocytes also control systemic glucose homeostasis through storing glucose as glycogen. They store vitamins A, B, D and E, and also participate in their metabolism. Thanks to the cytochrome P450 (CYP-450)-dependent monooxygenase system, the liver regulates the reactions of xenobiotic oxidation, hydroxylation or reduction, being a real systemic “tycoon” in this respect. The constitutive forms of the above-mentioned cytochromes metabolize steroids, cholesterol, bile acids, prostaglandins and leukotrienes [16].

The location of the liver among the branches of the celiac trunk and portal vein is conducive to its special role in synthesis and biotransformation. The nutritional vasculature represented by the hepatic artery supplies the organ with oxygenated blood, while at the level of precapillary vessels, its smaller branches equipped with muscle cell groups fulfil the role of sphincters, accessed by nonmyelinated, preganglionic autonomic system nerve fibres that regulate blood flow at the level of functional units. In turn, the portal vein that carries venous blood from the pancreas, spleen and intestines, supplies the organ with a large amount of nutrients, building substances, iron and hormones. Via this route, the liver is supplied with such substances as insulin, glycogen, GEP hormones and some cytokines, including IL-1 and IL-6.

Significant blood flow through the liver, amounting to approximately 100–130 ml/min/100 g of tissue

creates privileged conditions for this organ, and the gradient distribution of partial oxygen pressure in particular zones of a lobule or a simple acinus is one of the reasons for their morphological and biochemical heterogeneity.

2. Hepatic parenchymal cells

2.1. Structure and function of hepatocytes

In rat liver, hepatocytes account for 60%–67% of the total number of cells, at the same time constituting 84.2% of the liver volume. The hepatocytes are an element of the bi-cellular hepatic trabeculae that are washed by blood flowing in sinusoid capillaries. The nuclear membranes of each cell that is a component of a hepatic trabecula form paired indentations in their internal part, which become the structural foundation of a bile capillary. The capillary collects and carries bile within the structure of a lobule or hepatic acinus from the centre, or zone III, to the periphery, or zone I. Subsequently, the transported bile travels through the Hering ductule to the interlobular bile ductule, which is situated within the hepatic triad.

Each hepatocyte forming a part of a hepatic trabecula has a blood (sinusoidal) pole that communicates with sinusoid capillaries, and an excretory biliary pole that carries bile components – phospholipids, ions, water and other metabolites – to the above-mentioned ductules. Outside the regions of the bile capillaries, the surfaces of the plasma membranes of adjacent hepatocytes form yet another pole, the so-called contact zone or exchange pole. This manner of hepatocyte organisation in a hepatic trabecula with respect to each other and blood and bile capillaries, determines their functional and structural multiaxial character. It also necessitates a relatively even distribution of the organelles in the cytoplasm. The total area of the liver occupied by the sinusoidal pole of hepatocytes is really imposing, amounting to approximately 430 m², while the contact zone is estimated to occupy 169 m², and the bile pole – 37 m². These numbers illustrate the exceptional abilities of the hepatocytes in the uptake of oxygen, substrates, cofactors, hormones and neuromediators, and also point to the particularly privileged position of the discussed cells in absorbing and releasing substances produced therein. Both the sinusoidal and bile pole membranes produce microvilli, which are capable of horizontal movement, shortening and elongation, which profoundly increases the absorption and release surface. The microvilli are coated with glycocalyx, in which ab-

sorption – facilitating receptors and enzymes are suspended. The plasma membranes that make up the bile capillaries are closed by zonula occludens-type tight junctions. In this way, blood, flowing centripetally from the periphery of the lobule or simple acinus to its centre is separated from bile carried in the capillaries in the reverse direction. In turn, the contact zones of the hepatocytes communicate through extensive and numerous slit junctions, which not only allow structural integration of the hepatocytes situated within the hepatic trabeculae, but also provide foundations for forming a complex and functionally integrated cellular network. The above-mentioned junctions allow intercellular exchange of Ca^{+2} ions, amino acids, sugars, nucleotides and intermediate transmitters, including e.g. cAMP. The central place in the majority of hepatocytes is occupied by a single, oval or round nucleus. A high percentage of nuclear chromatin is despiralised. Heterochromatin is situated in the imminent vicinity of the lamina propria of the nuclear capsule, also appearing in the form of scattered, irregular aggregates inside the nucleus and around the nucleolus. The nucleolus, with a typical fibrous-glandular organisation and of large size, is often located extracentrally. In the nuclear capsule, numerous nuclear pores are seen. In the course of individual development, and especially when a neonate switches to per os feeding, polyploidization gradually occurs; the term denotes an increase in the number of nuclei in hepatocytes. The process most likely results from an increasing load imposed on the parenchymal cells by successive biochemical changes, which forces multiplication of gene copies without undue energy expenditure resulting from cytoplasm division. When complete homeostasis is maintained in the organ, mitotic activity of the parenchymal cells is low. In a 30-day old rat, the frequency of occurrence of mitosis in the liver is estimated not to exceed one per mille per 24 hours. On the other hand, the life span of the hepatocyte is considerable, equalling approximately 150 days. Thus, other justifications of polyploidisation occurrence are taken into consideration, such as the mechanism protecting the genetic material of the cells against damage provoked by reactive oxygen species, which are produced in the course of exogenous and endogenous substrate transformation in the liver. Another acceleration spurt of hepatocyte nuclei polyploidization occurs in the second and third decade of life, and subsequently polyploidisation slowly continues. The percentage of hepatic cells that contain a supradiploid amount of DNA in an individual in the eighth decade of life is as follows: 80% of diploid, 16% of tetraploid and 4% of octaploid hepatocytes.

A considerable percentage of the surface area of hepatocyte cytoplasm is occupied by the smooth and rough endoplasmic reticulum, which strongly reacts both quantitatively and qualitatively to endogenous and exogenous factors. The rough reticulum is formed of parallel, long and narrow stacks of cisterns, whose surface is covered with ribosomes. The cistern stacks form a separate, extensive cellular compartment, which exhibits direct structural associations with the nuclear envelope, mitochondria and the Golgi complex. Such associations are dynamic in character, which is expressed by the variable number of direct contacts between the membranes of the cisterns within the endoplasmic reticulum and the mitochondrial lamina propria. The frequency and number of the said contacts increases between 2 p.m. and 10 p.m., or, in other words, during the peak activity of protein synthesis in the hepatocytes. It also reflects the degree of transport of structural and enzymatic proteins formed in the endoplasmic reticulum to the internal lamina and matrix of the mitochondria.

The smooth endoplasmic reticulum, with its architecture consisting of relatively short canaliculi and vacuoles of variable diameters, which directly branch off the rough reticulum, exhibits close territorial associations with aggregates of glycogen molecules filling glycogen fields of varying intensity. The smooth reticulum is formed either *de novo* following induction by certain medications (phenobarbital), or as a consequence of ribosome loss by the rough reticulum. The reduction of membrane potential of the smooth endoplasmic reticulum is often correlated with a decrease in the contents and activity of the CYP-450-dependent monooxygenase system.

Another structure that is associated with the smooth and rough reticulum via specialised canals and low electric density transit vesicles is the Golgi complex. It contains from several to less than twenty smooth, parallelly oriented cisterns linked by a stabilising system of microtubules. The Golgi complex is most frequently located around the nucleus and adjacent to the excretory pole neighbouring a bile capillary. Large vacuoles, which contain lipid material – VLDL are situated in the vicinity of distended large cisterns. The material is composed of cholesterol, phospholipids, triglycerides synthesised in the smooth endoplasmic reticulum and apoproteins B, C and E, which are produced on the ribosomes of the rough reticulum.

A highly variable, diurnally and seasonally fluctuating number of vesicles and vacuoles, heterogeneous in their sizes and contents are observed in the vicinity of the Golgi complex dictiosomes and smooth reticu-

lum, and especially in the immediate vicinity of bile capillaries. Some of them are small, uniformly electron dense and contain no substances or structures undergoing the process of digestion – these are the primary lysosomes. Others, much larger and with the matrix containing remnants of digested structures or exogenous substances, are termed the secondary lysosomes. Still others, also of a large size, characterised by a waning activity of indicator enzymes, including AcP, and an advanced stage of digestion of phagocytised substances, are called the residual bodies. In an average hepatic cell, the number of lysosomes is estimated as 180–300. Both the lysosomes and AcP activity exhibit a high degree of regionalization within an acinus, being concentrated in the zone III hepatocytes.

The hepatocytes situated in zone III of the acini also have a greater number of peroxisomes as compared to the other zones, i.e. approximately 200 per one hepatocyte. These small structures, 0.1 to 1.5 μm in diameter, in some animal species contain pseudocrystalline nucleotides (cores) in their granular matrix. The cores store urate oxidase – an enzyme involved in purine metabolism. Other enzymes contained in the peroxisomes, such as L- α -hydroxy acid oxidase and L-amino acid oxidase, participate in hydrogen peroxide generation and ethyl alcohol, methyl alcohol and formaldehyde metabolism. In turn, catalase and glutathione peroxidase guarantee metabolism of free radical compounds, including hydrogen peroxide. These structures are also an important centre of hepatic glucogenesis and fatty acid β -oxidation.

Hepatocytic mitochondria belong to the class of crested mitochondria, with an average level of internal lamina development. The number and diameter of these organelles in the parenchymal cells from particular acinar zones is indeed diversified. Thus, in zone I, they are large and oval, and their number is estimated as approximately 800 per one cell. Succinic dehydrogenase activity in this zone occurs at the maximum level. In acinar zone III, the hepatocytes contain many more – approximately 1200–2000 – small and round mitochondria, while the activity of succinic dehydrogenase is less intense. Mitochondrial activity exhibits diurnal and seasonal fluctuations correlated with the rough endoplasmic reticulum. In the 1970s and 1980s, many arguments were put forward in support of electron transfer between the mitochondrial and reticular electron transfer chains via cytochromes b5 contained in both organelles. This is of particular importance under conditions of intensified hepatocytic load with toxic substances [9, 16].

2.2. Hepatocyte heterogeneity

Hepatocyte heterogeneity within the hepatic acinus has both a morphological-morphometric and a functional aspect [8]. The hepatocytes may be divided into cells that accompany the hepatic triads and tetrads (periportal hepatocytes or hepatocytes of acinar zone I) and cells that are situated around the central veins (centrolobular hepatocytes or hepatocytes of acinar zone III). The hepatocytes located in zone II usually demonstrate intermediate structural and functional properties as compared to the two previously mentioned types. The hepatocytes contained in acinar zone III are larger in size, have a more extensive smooth endoplasmic reticulum (21,600 μm^2) and a higher number of small mitochondria; in their cytoplasm, they store pigments, reserve substances, including glycogen and fatty compounds. On the other hand, zone I hepatocytes are significantly smaller and the smooth reticulum is more poorly represented (approximately 15,700 μm^2). The less numerous, larger, elongated mitochondria are characterised by an increased number of crests and an increased matrix area.

In zones I, the predominant processes are protein regeneration, synthesis and decomposition, gluconeogenesis, synthesis of urea and bile acids, and aerobic and anaerobic energy generation. Zones III are the sites of xenobiotic and endogenous substrate metabolism, storage of reserve substances, the processes of glycogenolysis, storage and release of pigments and bile acids [2].

In the nineteen eighties and nineties, doubts emerged as to the legitimacy of an inflexible division of the acinus into three functional zones. These doubts were confirmed by the scope and variability of distribution in the acinus of the activity of numerous indicator enzymes, in the light of new discoveries describing the angioarchitecture of the hepatic circulation, etc. [11]. The division of the acinus into three stable zones, classified according to particular features, became excessively static and did not take into consideration the effect of local regulatory factors, which significantly affect the activity of the hepatocytes and their collaborators – NPC cells. At that time, it became clear that the structural, morphometric and biochemical heterogeneity of the hepatocytes was dependent on many diversified factors, the most important of which include:

- both the vector and the collateral blood flow, which impose given concentration parameters on oxygen, substrates, cofactors and metabolites in particular acinar zones;

- a different level of hepatocyte differentiation, with a variable number and availability of receptors controlling gene expression;
- a local ability of hepatic and NPC cells to secrete autocrine and paracrine cytokines and growth factors that modify their function [12, 13, 14, 15].

3. Nonparenchymal hepatic cells (NPC)

3.1. Kupffer cells

The Kupffer cells are mononuclear phagocytes, which are characterised by a stable, intravascular localisation. They occupy a special place among NPC cells. They communicate with the endothelial sinusoid cells, hepatocytes, stellate Ito cells and pit cells, extending their long processes via the pores to Disse's space [10]. They do not create direct structural junctions with other NPC cells and hepatic cells. The Kupffer cells constitute approximately 20% of all NPC cells, and their number may be increased through recruitment of circulating monocytes. This happens when inflammatory processes are intensified. The hepatic macrophages constitute 80% of the pool of all tissue macrophages [10]. When liver homeostasis is maintained, they are small and spindle-like. They have large, oval, strongly hematoxylin-stainable nuclei. Poorly stained acidophilic cytoplasm with clusters of basophilic granules is situated around the nucleus. The picture changes as a consequence of a toxic or inflammatory stimulus effect. Then, the Kupffer cells become enlarged, their shape is changed into stellate, and the nuclear membrane produces numerous invaginations. Electronograms show that Kupffer cells surpass endothelial cells in terms of size. The cytoplasm is filled with interrelated stacks of rough endoplasmic reticulum cisterns and adjacent free ribosomes and polyosomes. Almost 13–20% of the cytoplasm surface area is occupied by the Golgi complex dictyosomes, especially the abundant and heterogeneous population of primary and secondary lysosomes, multivesicular and residual bodies, where 50% of hepatic AcP activity takes place. In the vicinity of the plasmolemma, numerous endosomes and pinocytic vesicles are located. The processes and placations of the macrophage cellular membrane are characterized by their ability to perform movements resulting from interactions between the membrane, cytoskeleton and extracellular matrix. The membrane is coated with 40–60 nm glycocalyx, which is composed of oligosaccharides coupled to proteins and integral and surface membrane proteins. The glycocalyx facilitates direct adherence-type rela-

tions between the hepatocytes and NPC cells, and is also the site where numerous extremely important allo-antigens and receptors are located. Among other things, on the Kupffer cell membrane surface there are situated glycoprotein products of genes located on chromosome 6, the so-called major histocompatibility complex (MHC) of both class I and class II. MHC assigns the role of APC cells to the hepatic macrophages [23]. The presence of CD16, as well as such complement receptors as CR1 (CD35), CR3 (CD11b, CD18), CR4 (CD11c, CD18) and C5aR in the glycoprotein envelope of the Kupffer cells opens up the possibility of receptor-mediated phagocytosis of antibody-coated antigens. In turn, CD4 expression allows the macrophages to act as shield cells against HIV.

Within the hepatic acinus, the Kupffer cells, similarly to the hepatocytes, are characterized by structural and functional heterogeneity. Thus, in zone I, they are usually more numerous, larger in size and show a higher activity of lysosome enzymes. When we move towards zones II and III, their number and size decrease, while their cytotoxic activity against neoplastic cells increases. The basis of cytotoxicity is an enhanced release of free oxygen radicals, including the superoxide anion radical and hydroxyl ion, release of TNF and some lysosomal proteases. The key role in the process is also ascribed to IL-1 and its receptors; the amount of the latter is subject to an autoregulatory increase on the surface of the activated macrophages. In addition to their phagocytic role, the Kupffer cells fulfil extensive secretory functions [22]. They produce substances of molecular mass ranging from 32D – superoxide anion radical – to 440,000D – fibronectin. The hepatic macrophages produce and release:

1. peptide hormones – IL-1, IL-6, IL-8, TNF, INF, INF, thymosin 4 and endothelins;
2. growth factors – HGF, PDGF, FGF, TGF, G-CSF, GM-CSF;
3. components of the classic and alternative component activation pathways C1q, C2, C3, C4, C5; factors B, D;
4. reactive peroxides;
5. enzymes: proteases (elastase, collagenase), lipases (phospholipase A2), glucosaminidases (lysosyme), lysosomal hydrolases (proteases, phosphatases, glycosydases – (deoxy- and ribonucleases));
6. enzyme and cytokine inhibitors;
7. adhesion (adherence) proteins, such as fibronectin;
8. metal-binding proteins – metaloproteins, transferrin, transcobalamine;
9. lipid-binding proteins – apoprotein E;
10. bioactive oligopeptides – glutathione;

11. products of arachidonic acid lipooxygenation and cyclooxygenation – LTB₄, LTD₄ and PGE₁, PGF₂, PGD₂;
12. purine and pyrimidine derivatives;
13. coagulation factors – plasminogen activator and inhibitor, plasmin inhibitor, PAF.

The Kupffer cells and the remaining NPC cells and hepatocytes are connected by a network of structural and functional associations, which are implemented by the secreted substances and receptors situated on the cellular membranes of the interacting cells. The Kupffer cells have an extended system of bilateral ties with the stellate cells. In the case of the macrophages, these ties are provided by PDGF, TGF, IL-6 and IL-8. In the case of the Ito cells, the leading role is played by M-CSF [18]. Thus, on the one hand, in the case of the liver sustaining toxic, metabolic or immunological damage, the macrophages induce proliferation of the Ito cells and their phenotypic transformation into intermediate cells, and subsequently into myofibroblasts, while on the other hand, thanks to M-CSF synthesis and release, the Ito cells stimulate proliferation and differentiation of the hepatic macrophages [18].

3.2. Stellate cells (Ito cells)

In the literature on the subject, slightly fewer than twenty terms are used with reference to the above-mentioned cells. In 1986, it was decided that the term “stellate cells” or “Ito cells”, to honor their discoverer, was the most appropriate. Morphological assessment and morphometric measurements indicate that in the liver of rodents, the population of the stellate cells accounts for 5 to 10% of all liver cells [25]. In the healthy human liver, the ratio of stellate cells to hepatocytes is 7–15 per 100 [27]. The stellate cells account for as much as 97% of all NPC cells in Disse’s spaces. The cells are equipped with two types of processes, which extend towards the hepatocytes (intersinusoid processes), and to the sinusoid vessels (subendothelial processes). The processes are linked with the hepatocytes and endothelium by maculae adherens and slit junctions. This form of links between the stellate cells and vascular endothelial and parenchymal cells points to their playing the role of an active mediator that participates in substrate or product exchange, as well as in information transfer between these cells [6]. The number of the stellate cells in hepatic acini is variable and – it would seem – is correlated with vitamin A level. A decrease in vitamin A level, which occurs in toxic liver damage evoked by carbon tetrachloride or alcohol, is associated with a drastic reduction in the number of the Ito cells [10]. Identification of the stellate

cells by light microscopy is not difficult. They may be detected by employing the method of gold chloride impregnation, taking advantage of vitamin A autofluorescence, or detecting desmin by immunocytochemistry [5]. In the cytoplasm, electronograms show the presence of membrane-encapsulated or non-encapsulated lipid droplets (1–3 μ m), which store vitamin A as retinyl esters. The cytoplasm also demonstrates the presence of a low number of crested mitochondria, moderately developed rough and smooth endoplasmic reticulum and well-developed structures of Golgi complexes [19]. The number of Ito cells in the particular zones of hepatic acini seems to be similar. However, a striking feature is their structural heterogeneity. Thus, in zone I, they are generally low in fat droplets and have short cytoplasmic processes, while in zone III, they are characterized by irregular outlines, lack of desmin filaments and fatty droplets in the cytoplasm. In zone II, they are large, have extensive cytoplasmic processes and a high content of fat and desmin.

When the liver is structurally and metabolically “at peace”, the stellate cells contain a high number of lipid droplets and participate in the processes of retinoid storage and retinoid oxidation to retinoic acid made possible by ADH. The retinoids are responsible for stabilisation of their resting state, inhibition of the synthesis of collagen and other extracellular matrix proteins. The stellate cells produce the highest amount of extracellular substance, collaborating in this respect with the hepatocytes and Kupffer cells [7]. They also produce metalloproteinases and their inhibitors, thus regulating the distribution of the extracellular matrix.

According to estimates, approximately 80–90% of hepatic vitamin A and its metabolites are stored in the stellate cells, which recruit vitamin A from the hepatic cells or directly from the plasma through specialised receptor proteins – RDP. In turn, in the cytosol of target cells, retinol is oxidised to retinoic acid and affects the activity of transcription processes through binding to the nuclear receptors RAR [17].

Stellate cell excitation is associated with a profound conversion (restructuring) of their structure and function. Such a situation occurs for example when the liver is damaged by toxic substances, medications, antigens or metabolic factors. An increased recruitment of monocytes and granulocytes, activation of the Kupffer cells that takes the form of increased cytokine release, as well as production of acute phase proteins by the hepatocytes result in rapid proliferation of stellate cells, an increase in their diameter and a loss of their ability to store vitamin A [5]. Subsequently, they are transformed into myofibroblasts, which intensively produce type I, III, IV and VI collagen, fibronectin,

laminin, entactin, tensin, onduline and other glycoproteins and proteoglycans [4]. As the processes of phenotypic transformation into myofibroblasts progress, connective tissue septa are formed in Disse's spaces, as well as in other liver fragments, and basement membranes develop in the vicinity of the sinusoid vessels; the latter disturb the effectiveness of blood-hepatocyte and NPC cells exchange of substrates, hormones, neuromediators and other products [5]. Progressive capillarization of the capillary vessels occurs; the phenomenon consists in a decrease in the number and diameter of pores in the vascular endothelial cells [26]. A factor that strongly induces the above-described transformation is ethanol and its major metabolite acetic aldehyde. Myofibroblasts release TGF- α and TGF- β 1. The latter cytokine is rapidly being recognised as the major autocrine and paracrine factor regulating fibrosis of the liver, which at the same time potentiates synthesis of collagen and other extracellular matrix proteins and inhibits their decomposition through blocking the activity of proteases and metalloproteinases.

The stellate cells are also believed to play an extremely crucial role in regulating blood flow through the liver [6]. This activity is associated both with the presence of α 1 adrenergic receptors on the surface of the hepatocytes, and with the close communication of the Ito cells with the sinusoid and parenchymal capillaries through the processes and slit junctions. Noradrenaline and ATP reaching the adrenergic receptors, as well as increased expression of the cell adhesion proteins N-CAM initiate the synthesis of PGF-2 and PGD2 in the Ito cells. Thus, the Ito cells participate in storing and releasing retinoids, regulate secretion of numerous mediators and chemoattractants and control blood flow [6]. Myofibroblasts, on the other hand, affect the level of fibrosis.

3.3. Endothelial cells

The endothelial cells, which originate from the mesenchyma, have an elongated polygonal shape, 10–15 μ m high and 20–50 μ m long. Their life span is approximately 90–120 days [24]. The nuclei of the endothelial cells are situated in cytoplasmic aggregates, which – apart from other sparse structures, contain clear vesicles that transport various substances across the cell wall, either physically, or *via* receptors using their own energy resources. The 100 nm wide pores are the route of macroparticle exchange between blood and Disse's space, with the exception of morphotic elements and chylomicrons. The diameter of the pores and groups of them termed cribiform laminae is not

stabilised due to the extensively developed cytoskeleton structure. The cytoskeleton also modifies the height of the cells, which significantly affects the size of blood stream flowing along the hepatic trabeculae.

The free surfaces of the epithelium are covered with a relatively thick glycosaminoglycan coat, which binds water and proteoglycans, as well as captures growth factors. The presence of adhesion proteins, selectin E, P and CAM-1 on the surface of the epithelial cells easily allows not only cell adhesion, but also diapedesis.

The endothelial cells produce numerous hormones, growth factors and cytokines. They also produce the entire family of prostaglandins, with the most prominent being PGI₂, which dilates blood vessels and prevents blood platelet aggregation. The endothelial cells synthesise and release endothelins, which cause shrinkage of the vascular muscular coat. They are also characterised by strong mitogenic-angiogenic activity. In the endothelial cells, nitric oxide synthases are activated, both in their active and inducible forms. Synthase generates nitric oxides from arginine; nitric oxides easily penetrate the muscular layer of the arterioles and activate guanyl cyclase. Decreasing the cytosol level of calcium ions, the resultant cGMP leads to decontraction of the vascular muscular coat.

Apart from the kidneys and lungs, the vascular epithelium of the liver contains angiotensin convertase, a proteolytic enzyme, whose substrate is angiotensin I originating from angiotensinogen. The peptide is capable of exerting a strong, albeit short-lasting, pressive effect on the vascular bed. Cytokines released by active hepatic macrophages initiate the synthesis of IL-1, IL-6 and TNF- α in the endothelial cells. On the surface of their membranes, there are receptors for histamine, bradykinine, substance P, acetylcholine and other substances. Association with receptors initiates the activity of the constitutive form of nitrogen oxide. Acting through PGD2 and PAF, the epithelial cells regulate the level of glycogenolysis in the hepatocytes. When the Kupffer cells are subject to toxic damage, the epithelial cells undertake immunophagocytic function.

3.4. Pit cells

The pit cells constitute yet another subset of NPC cells, and are composed of 36% NK-T lymphocytes, 25% NK lymphocytes and 25% TCR lymphocytes. The NK cells are characterised by natural cytotoxicity. They constitute a separate class of lymphocytes, characterised by spontaneous readiness to kill target cells, including neoplastic and virus-transformed cells. Eradi-

cation of target cells occurs without any MHC restrictions. The NK lymphocytes also play an important immunoregulatory role. They are mostly situated in the peripheral blood (accounting for approximately 10% of circulating lymphocytes), as well as in the liver, lungs, spleen and intestinal mucosa. To date, the mechanisms affecting NK cell circulation and life span remain unknown. In the liver, they are located in Disse's spaces and sinusoid capillaries. In the latter, especially following IL-2 induction, they demonstrate a close relationship with the Kupffer cells. The above-mentioned cytokine is a potent inducer of proliferation and cytotoxicity of the two types of NPC cells. The plasma membrane of the NK lymphocytes produces numerous microvilli and plications, where numerous surface antigens are situated, such as CD2, CD8, CD11, CD16 and CD56. The presence of the CD16 receptor, which allows binding of IgG-coated antigens, makes it possible for the NK cells to participate in the process of ADCC antibody-dependent cytotoxicity. The central part of the NK leukocyte is occupied by a large, kidney-shaped nucleus with well-developed heterochromatin. Within the nucleus, a large, single nucleolus may be seen. An extensive portion of the surface area of the cytoplasm is occupied by azurophilic granules, which are divided into three classes based on electron microscopy: medium-sized and large granules, large vacuoles and vacuoles with smaller diameters. There, lysosomal enzymes are situated, as well as peroxidases, perphorins and granzymes. The NK cells originate from bone marrow precursors other than B and T lymphocyte precursors, and their generation is affected by IL-2, INF- γ , INF- α and local environmental factors. The NK cells that are situated in the liver maintain their ability to proliferate. The most potent growth factor, which at the same time potentiates cytotoxicity of the NK cells, is IL-2.

4. Hepatic vasculature and lymph circulation

Every minute, 1500 ml of blood reaches the liver; of this volume, 1200 ml originates from the portal vein, and the remaining amount from the hepatic artery and branches of the gastric and gastroduodenal arteries. Several features set apart the hepatic circulation from that of other organs:

1. the organ has both nutritional and functional vasculature;
2. at the capillary level, both types of vasculature merge and the blood is mixed;
3. the interlobular and perilobular arterioles are resistance vessels;

4. the interlobular veins and terminal venules that carry blood to the sinusoids have walls devoid of muscle cells and composed solely of circuitously arranged collagen and elastic fibers;
5. the capillaries that carry blood washing the hepatic trabeculae are sinusoid vessels, and the processes of the endothelial cells have 100 nm pores grouped together to form the cribriform laminae;
6. veins with a diameter above 400 nm, which carry blood towards the hepatic veins, have a circuitous layer of smooth myocytes and play a resistant role;
7. along their entire course, the veins have no valves;
8. when liver homeostasis is maintained, approximately 75% of the sinusoid capillaries do not participate in circulation.

The vessels entering the liver through the hilus can be divided into the lobular and segmental arteries and veins, which run along the axis of the complex acini. As the interlobular and perilobular arterioles and veins, in the simple acini they discharge blood to the sinusoids. A portion of the total blood volume also supplies the interlobular biliary canaliculus through the capillary network. In turn, the sinusoid capillaries that converge in the centre of a lobule transfer blood to 45 μ m-wide central veins, which have a number of circuitously arranged reticulin fibers beneath the endothelium. The central veins carry blood to the sublobular, collective and hepatic veins, which empty into the vena cava.

The liver is a significant site of lymph production. The lymph appears at the level of Disse's spaces, and the smallest lymph vessels are situated in the interlobular connective tissue of the portobiliary spaces. Lymph drainage occurs through two systems of lymph vessels: the superficial and deep lymph networks. The former collects lymph from the peripheral hepatic lobules and transfers it to the celiac, sternal, mediastinal and lumbar lymph nodes. The deep lymph network drains the central part of the hepatic parenchyma, and then lymph is directed via the lymphatic vessels along the branches of the portal vein or hepatic veins to the celiac or mediastinal lymph nodes, respectively.

5. Bile ducts

The bile ducts begin with the biliary capillaries, 0.5–1 μ m in diameter. The capillaries are composed of hepatocytes that form the hepatic trabecula. The plasma membranes of the secretory poles of the hepatic parenchymal cells, which close the above-mentioned canaliculi, exhibit activity of AP, Mg^{+2} -ATPase and 5-NT. On the periphery of the lobules, the network of

the biliary capillaries is transformed into the biliary ductules canaliculi of Hering, partially layered with simple cuboid epithelium with microvilli, the cytoplasm of which shows fat vacuoles, single mitochondria and numerous elements of smooth endothelial reticulum and Golgi complex groups. Other segments of the walls are composed of hepatocytes. The Hering ductules transfer bile to the interlobular bile ductules, which are an element of the hepatic triads. The triads are initially layered with simple cuboid endothelium, and – as their diameter increases – with simple columnar epithelium, which is situated on the basement membrane characterised by a strong reaction to mucopolysaccharides. The electronograms of the above-mentioned cells show the cytoplasm to abound in numerous lipid droplets, glycogen granules, long-crested mitochondria, extensively developed smooth reticulum and numerous Golgi complex dictyosomes. The free surface of the cells contains numerous microvilli. Considerable plication has also been observed on the lateral and basal surfaces. Within the epithelium of the interlobular bile ductules, electron-dense inclusion cells have also been identified. Most likely, they constitute a pool of reserve cells, which are responsible for regeneration. At the level of the transverse septum, the interlobular ductules, and subsequently, the increasingly large bile ducts form the right and left hepatic duct, which merge, and then – joining with the cystic gall duct, they form the 8–12 cm long common bile duct, which empties into the duodenum in the ampulla of Vater. In the common hepatic duct, the muscular coat consisting of smooth muscle fibres is significantly extended and assumes the form of a full-thickness layer containing circuitously arranged myocytes. Two potent sphincters are situated within the opening of the bile duct into the duodenum.

References

1. Bardadin K. A., Makrofagi wątrobowe (komórki Browicza-Kupffera), *Medical Science Review* 2004, 4, 12–18.
2. Buhler R., Lindros K. O., Nordling A. [et al.], Zonation of cytochrome P-450 isozyme expression and induction in rat liver, *European Journal of Biochemistry* 1992, 204, 407–412.
3. Czekaj P., Wiaderkiewicz R., Kamiński M., Niezróżnicowane komórki wątroby, *Medical Science Review* 2004, 4, 19–27.
4. Eng F. J., Friedman S. L., Fibrogenesis. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex, *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000, 279, 7–11.
5. Flisiak R., Role of Ito cells in the liver function, *Polish Journal of Pathology* 1997, 48, 139–145.
6. Geerts A., History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic cells, *Seminars in Liver Diseases* 2001, 21, 311–335.
7. Gong W., Pecci A., Roth S. [et al.], Transformation – dependent susceptibility of rat hepatic stellate to apoptosis induced by soluble Fas ligand, *Hepatology* 1998, 28, 492–502.
8. Gumucio J.J., Hepatocyte heterogeneity, The coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation, *Hepatology* 1989, 3, 154–160.
9. Hindupur K., Theerthavarada A., Sankar A. [et al.], Localization of multiple forms of inducible cytochromes P-450 in rat liver mitochondria: Immunological characteristics and patterns of xenobiotics substrate metabolism, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997, 1, 136–150.
10. Jones E. A., Summerfield J. A., Kupffer cells, the liver biology and pathology, Arias I., Jakoby W. B., Popper H. [et al., eds.], Raven Press, New York 1998.
11. Jungermann K., Thurman R. G., Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates, *Enzyme* 1992, 46, 33–58.
12. Jungermann K., Kietzmann T., Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver, *Kidney International* 1997, 51, 402–412.
13. Jungermann K., Zonation of metabolism and gene expression in liver. Histochem, *Cell Biology International* 1995, 103, 81–95.
14. Jungermann K., Kietzmann T., Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver, *Annual Review of Nutrition* 1996, 16, 179–203.
15. Jungermann K., Kietzmann T., Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver, *Hepatology* 2000, 31, 255–259.
16. Kamiński M., Wiaderkiewicz R., Orschulik M., Układ monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 w metabolizacji ksenobiotyków i endogennych produktów przemian, *Medycyna Pracy* 2001, 52, 19–26.
17. Kopeć-Szlęzak J., Rola komórek gwiaździstych w metabolizmie witaminy A, *Postępy Biologii Komórki* 1992, 19, 77–86.
18. Kopeć-Szlęzak J., Współdziałanie makrofagów wątroby z hepatocytami i nieparenchymalnymi komórkami wątroby, *Postępy Biologii Komórki* 1994, 21, 227–238.
19. Lebensztain D. M., Sobaniec-Totowska M. E., Bożym-Kulczyk M. [i in.], Biologia i morfologia włóknienia wątroby, *Medical Science Review* 2004, 4, 5–11.
20. Loeper J., Descatoire V., Mauric M. [et al.], Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: Recognition by several autoantibodies, *Gastroenterology* 1993, 104, 203–216.

21. Marszałek M. T., Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka, Część I, *Postępy Biologii Komórki* 1999, 26, 135–158.
22. Marszałek M. T., Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka, Część II, *Postępy Biologii Komórki* 1999, 26, 159–179.
23. Matsuoka M., Tsukamoto H., Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cells – derived transforming growth factor – B: Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis, *Hepatology* 1990, 11, 599–605.
24. Matsuno K., Nomiya H., Yoneyama H., [et al.], Kupffer cell mediated recruitment of dendritic cells to the liver crucial for a host defense, *Clinical and Developmental Immunology* 2002, 9, 143–149.
25. Paprocka M., Duś D., Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonnów naczyniowych, *Postępy Biologii Komórki* 2000, 27, 200–247.
26. Phillips M. J., Poucell S., Patterson J., The liver. An atlas and text of ultrastructural pathology, Raven Press, New York 1987.
27. Schaffner F., Popper H., Capillarization of hepatic sinusoids in man, *Gastroenterology* 1963, 44, 238–242.
28. Sztark F., Dubroca J., Latry P. [et al.], Perisinusoidal cells in patients with normal liver histology, *Journal of Hepatology* 1986, 2, 358–369.

Corresponding author

Marcin Kamiński
Katedra Morfologii, Zakład Histopatologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
e-mail: sekhistemb@sum.edu.pl

APPENDIX 1. LIST OF ABBREVIATIONS

AcP	acid phosphatase
ADCC	antibody-dependent cellular toxicity
SMA	alpha smooth muscle actin
AMP	adenosine-monophosphate
APC	antigen presenting cell
ATP	adenosine triphosphate
B	component factor B
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
C1q, C2, ...	component factors
CD2, CD4, ...	cell differentiation complexes
CEA	carcinoembryonic antigen
CK-7, CK-19	cytokeratins
CR	complement receptor
CR1	complement receptor (CD35)
CR3	complement receptor (CD116, CD18)
CR4	complement receptor (CD11c, CD18)
C5aR	complement component C5a receptor
CSF	colony stimulating factor
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
smult1M-CSF	macrophage colony stimulating factor
CYP 450	cytochrome P-450
D	complement factor D
DNA	deoxyribonucleic acid
ET1, ET2, ET3	endothelins
FcR	Fc fragment receptor
FGF	fibroblast growth factor
GEP	gastroenteropancreatic system
GMP	guanosine-monophosphate
c-GMP	cyclic guanosine-monophosphate
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
ICAM	intercellular adhesion molecule
Ig	immunoglobulin
IgA	immunoglobulin A
IgG	immunoglobulin G
IL1, IL2, ...	interleukins
INF	interferon

APPENDIX 1. LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

INF , ,	interferon , ,
LAF (CD58)	integrin responsible for cell adhesion
LGL	large granular lymphocyte
LT	leukotriene
LTB4	leukotriene LTB4
LTD4	leukotriene LTD4
MHC-I, II	major histocompatibility complex class I and class II
N-CAM	neuronal cell adhesion molecule
NK	cytotoxic NK cell
OV-6	antigen present on the surface of oval cells and cholangiocytes
PAF	platelets activating factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PGE	prostaglandin E
PGE2	prostaglandin E2
PGF2	prostaglandin F2
PGD2	prostaglandin D2
PGI2	prostaglandin I2, prostacyclin
RAA	renin-angiotensin-aldosterone system
RAR	retinoic acid receptor
RNA	ribonucleic acid
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin
EGF	epithelial growth factor
TGF , 1, 2, 3	transforming growth factors , 1, 2, 3
TNF	tumor necrosis factor
TXA2	thromboxane A2

ROLA WĄTROBY W PROCESIE BIOTRANSFORMACJI KSENOBIOTYKÓW.

CZĘŚĆ I. STRUKTURA NARZĄDU, KOMÓRKI I ICH WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIE*

1. Wstęp

Wątroba to największy gruczoł egzokrynowy wydzielający także hormony – somatomedyny, erytropoetynę, składowe układu RAA i witaminę D. Jej masa wynosi u dorosłego mężczyzny około 1500–1800 g odpowiada 1/36–1/50 masy ciała. Narząd okrywa torebka Glissona, wpuklająca się wraz z naczyniami i nerwami do jego wnętrza. Przeważająca część wątroby pokryta jest otrzewną. Miąższ dzieli się na cztery płaty; dwa duże – lewy i prawy oraz dwa małe – ogoniasty i czworoboczny. Powierzchnia przeponowa jest wysklepiona i gładka. Powierzchnia trzewna posiada natomiast urozmaicony relief wynikający z obecności wycisków narządów sąsiadujących. Na wspomnianej powierzchni znajduje się także wnęką, przez którą wnikają do narządu: tętnica wątrobową, żyła wrotna, nerwy, a opuszcza przewód wątrobowy wspólny oraz część naczyń limfatycznych.

Gruczoł zbudowany jest z hepatocytów oraz komórek nieparenchymalnych (NPC) spoczywających na delikatnym zrębie łącznotkankowym. Liczbę hepatocytów szacuje się na 300 miliardów i są one zgrupowane w 500 000 zrazików anatomicznych.

Wśród NPC wyróżnia się komórki śródbłonkowe, gwiaździste (Ito), Browicza-Kupffera oraz komórki ziarnkowe stanowiące niejednorodną populację limfocytów wewnątrzwątrobowych [19]. Wątrobę buduje także nieliczna populacja (1–3%) komórek owalnych stanowiących heterogenną grupę komórek macierzystych zlokalizowanych w niszy narządowej skoncentrowanej wokół kanalików żółciowych Heringa [3, 20, 21].

Hepatocyty wytwarzają beleczki powiązane ściśle z naczyniami krwionośnymi oraz kanalikami żółciowymi. Ewolucja poglądów na wzajemne relacje pomiędzy beleczkami wątrobowymi, krążeniem czynnościowym, odżywczym oraz drogami żółciowymi, stała się podstawą wyodrębniania kolejnych jednostek organizacyjnych, a następnie strukturalno-funkcjonalnych. I tak wyróżniano zraziki anatomiczne (klasyczne), zraziki żółciowe (wrotne), gronka proste, złożone oraz agregaty gronek. W końcu zaproponowano także jednostkę mikrokrażenia składającą się z zmiennej liczby hepatocytów i komórek NPC, powiązanych nie tylko krążeniowo, lecz także funk-

cjonalnie, sprzęgniętych ze sobą za pomocą lokalnych oddziaływań parakrynowych i autokrynowych [1, 10].

Potencjał metaboliczny wątroby jest zaskakująco duży i obejmuje syntezę i wydzielanie żółci, produkcję albumin, i globulin, białek uczestniczących w procesach krzepnięcia krwi, syntezę niektórych aminokwasów, oksydacyjną dezaminację, transaminację i syntezę mocznika. W wątrobie powstają białka wiążące metale – metalotioneiny, transferyna, ceruloplazmina, białka ostrej fazy i -fetoproteina. Hepatocyty zapewniają także ustrojową homeostazę glukozy dzięki jej magazynowaniu w postaci glikogenu. Gromadzą witaminy A, B, D, E, uczestnicząc także w ich metabolizacji. Wątroba dzięki układowi monooksygenaz zależnych od cytochromu P450 (CYP-450) kształtuje reakcje utleniania, hydroksylacji lub redukcji ksenobiotyków, będąc pod tym względem ustrojowym „potentatem”. Formy konstytutywne wymienionych cytochromów metabolizują natomiast sterydy, cholesterol, kwasy żółciowe, prostaglandyny i leukotrieny [16].

Umiejscowienie wątroby pośród rozgałęzień pnia trzewnego i żyły wrotnej kreuje ową szczególną jej rolę syntezową, a także biotransformacyjną. Unaczynienie odżywcze reprezentowane przez tętnicę wątrobową dostarcza krew utlenowaną, a drobniejsze jej rozgałęzienia zaopatrzone w ugrupowania komórek mięśniowych pełnią na szczeblu naczyń przedwłosowatych rolę zwieraczy, do których docierają bezmielinowe, pozazwojowe włókna nerwowe układu autonomicznego regulujące przepływ krwi na szczeblu jednostek funkcyjnych. Z kolei żyła wrotna niosąca krew żylną z trzustki, śledziony i jelit doprowadza do narządu dużą ilość substancji odżywczych, budulcowych, żelazo, a także hormony. Tą drogą do wątroby docierają między innymi: insulina, glikogen, hormony układu GEP, część cytokin, w tym IL-1 oraz IL-6.

Znaczny jednostkowy przepływ krwi przez wątrobę wynoszący około 100–130 ml/min/100 g tkanki zapewnia temu narządowi uprzywilejowane warunki, a gradientowy rozkład ciśnienia parcjalnego tlenu w poszczególnych strefach zrazika lub gronka prostego kształtuje jedną z przesłanek ich morfologicznej i biochemicznej heterogenności.

* Niniejsza praca została przedstawiona jako wykład na sesji inauguracyjnej XXIV Konferencji Toksykologów Sądowych, która odbyła się w Wiśle w dniach 16–18 maja 2006 r.

2. Komórki mięszone (parenchymalne) wątroby

2.1. Budowa i funkcja hepatocytów

Hepatocyty stanowią w wątrobie szczura od 60%–67% wszystkich komórek, zajmując jednocześnie 84,2% objętości narządu. Wchodzą one w skład dwukomórkowych beleczek wątrobowych omywanych przez krew płynącą w naczyniach włosowatych zatokowych. Błony plazmatyczne każdej z komórek składających się na beleczkę wątrobową w częściach wewnętrznych wytwarzają parzyste zagłębienia, które stają się podstawą strukturalną kanalik żółciowego włosowatego. Zbiera on i transportuje żółć wewnątrz struktury zrazika lub gronka wątrobowego od jego centrum, czyli strefy III, do obwodu, czyli strefy I. Transportowana żółć przepływa następnie przez kanalik Heringa do kanalik żółciowego międzyzrazikowego leżącego w obrębie triady wątrobowej.

Każdy z hepatocytów wchodzących w skład beleczki wątrobowej dysponuje biegunem odżywczym kontaktującym się ze światłem naczyń włosowatych zatokowych oraz biegunem żółciowym wydzielniczym transportującym składowe żółci – fosfolipidy, jony, wodę oraz inne produkty przemiany do wspomnianych kanalików. Powierzchnie błon plazmatycznych przylegających do siebie hepatocytów tworzą, poza strefami kanalików żółciowych włosowatych, kolejny biegun, tzw. biegun kontaktowy lub biegun wymiany. Taki sposób posadowienia hepatocytów w beleczce wątrobowej w stosunku do siebie, naczyń krwionośnych i kanalików żółciowych wyznacza wieloosiowość funkcjonalną oraz strukturalną hepatocytów. Narzuca również stosunkowo równomierne rozproszenie organelli w ich cytoplazmie. Biegun odżywczy hepatocytów zajmuje globalnie w wątrobie imponującą powierzchnię sięgającą około 430 m², biegun kontaktowy szacuje się na 169 m², a żółciowy na 37 m². Powyższe liczby eksponują wyjątkowe możliwości hepatocytów w odbiorze tlenu, substratów, kofaktorów, hormonów, neuromediatorów i wskazują również na szczególnie uprzywilejowaną pozycję omawianych komórek we wchłanianiu i uwalnianiu produktów w nich powstających. Zarówno błony bieguna naczyniowego, jak i żółciowego, wytwarzają mikrokosmki, które dysponują możliwościami ruchu horyzontalnego i skracania oraz wydłużania się, co znacznie powiększa powierzchnię wchłaniania lub uwalniania produktów. Mikrokosmki pokrywa glikokaliks, w którym zawieszono są receptory i enzymy ułatwiające wchłanianie. Błony plazmatyczne składające się na kanalik żółciowy włosowaty zamykają złącza zwarte typu obwódki zamykających. W ten sposób krew spływająca dośrodkowo od obwodu zrazika lub gronka prostego do jego centrum jest odseparowana od żółci przepływającej w kanalikach włosowatych w kierunku przeciwnym. Z kolei biegunki kontaktowe hepatocytów są powiązane rozległymi i licznymi złączami

szczelinowymi, które nie tylko integrują strukturalnie hepatocyty ułożone w obrębie beleczek wątrobowych, lecz stwarzają przesłanki do formowania złożonej i zintegrowanej funkcjonalnie sieci komórkowej. Wspomniane złącza zapewniają wymianę pomiędzy komórkami jonów Ca⁺², aminokwasów, cukrów, nukleotydów, przekaźników pośrednich, w tym np. cAMP. Centralne miejsce w większości hepatocytów zajmuje pojedyncze, owalne lub okrągłe jądro komórkowe. Chromatyna jądrowa jest w poważnym odsetku zd spiralizowana. Heterochromatyna lokuje się natomiast w bezpośrednim sąsiedztwie blaszki wewnętrznej otoczki jądrowej, jak również przyjmuje formę rozproszonych, nieregularnych skupień we wnętrzu jądra oraz wokół jąderka. Jąderko o typowej organizacji włóknisto-ziarnistej i znacznych rozmiarach niejednokrotnie położone jest pozaśrodkowo. W otoczce jądrowej obecne są liczne pory jądrowe. W trakcie rozwoju osobniczego, a szczególnie w momencie przejścia noworodka na odżywianie *per os*, postępuje poliploidyzacja, to jest pomnożenie liczby jąder w hepatocytach. Ów proces wynika prawdopodobnie z narastającego obciążenia komórek mięszone przez kolejne przemiany biochemiczne, co wymusza pomnożenie liczby kopii genów bez ponoszenia nadmiernych wydatków energetycznych wynikających z podziału cytoplazmy. Aktywność mitotyczna komórek mięszone w warunkach pełnej homeostazy narządu jest niewielka. Ocenia się, iż u 30-dniowego szczura częstość występowania mitozy w wątrobie nie przekracza jednego promila w ciągu doby. Długość życia hepatocytów jest natomiast znaczna i wynosi ok. 150 dni. Rozważa się więc również inne uzasadnienie poliploidyzacji, widząc w niej mechanizm zabezpieczający materiał genetyczny komórek przed uszkodzeniem prowokowanym przez reaktywne formy tlenu, powstające w trakcie biotransformacji egzo- i endogennych substratów w wątrobie. Kolejne przyspieszenie poliploidyzacji jąder hepatocytów następuje w drugiej i w trzeciej dekadzie życia, a następnie jest wolno kontynuowane. Odsetek komórek wątrobowych zawierających ponaddiploidalną ilość DNA w ósmej dekadzie życia kształtuje się następująco: 80% hepatocyty diploidalne, 16% tetraploidalne i 4% oktaploidalne.

Znaczny procent powierzchni cytoplazmy hepatocytów zajmuje siateczka śródplazmatyczna szorstka i gładka, żywo reagująca zarówno ilościowo, jak i jakościowo na czynniki endogenne i egzogenne. Siateczka szorstka posiada formę równoległych, długich, wąskich pakietów cystern pokrytych na powierzchniach rybosomami. Tworzą one wyosobnione, obszerny kompartment komórkowy wykazujący bezpośrednie związki strukturalne z otoczką jądrową, mitochondriami oraz aparatem Golgiego. Owe związki mają charakter dynamiczny, co między innymi wyraża się zmienną liczbą bezpośrednich kontaktów pomiędzy błonami cystern siateczki śródplazmatycznej i blaszką zewnętrzną mitochondriów. Częstość i liczba wspomnianych kontaktów wzrasta po-

między 14 a 22 godziną, a więc w momencie szczytowej aktywności syntezy białek w hepatocytach. Odzwierciedla także zaawansowanie przepływu białek strukturalnych i enzymatycznych tworzonych w retikulum endoplazmatycznym do blaszki wewnętrznej i macierzy mitochondriów.

Siateczka śródplazmatyczna gładka uformowana w postaci stosunkowo krótkich kanalików i wakuoli o zróżnicowanej średnicy, bezpośrednio odchodzących od siateczki szorstkiej, wykazuje z kolei ścisłe terytorialne związki z ugrupowaniami cząsteczek glikogenu wypełniającymi mniej lub bardziej obszerne pola glikogenowe. Siateczka gładka powstaje albo *de novo* po indukcji niektórymi lekami (fenobarbitem), albo w wyniku utraty rybosomów przez siateczkę szorstką. Redukcja potencjału błonowego siateczki śródplazmatycznej gładkiej często jest skorelowana ze spadkiem zawartości i aktywności układu monooksygenaz zależnych od CYP-450.

Kolejną strukturą powiązaną z siateczką gładką i szorstką przez wyspecjalizowane kanały oraz pęcherzyki tranzytowe o niewielkiej gęstości elektronowej jest aparat Golgiego. Zawiera on kilka lub kilkanaście gładkich, równoległych w stosunku do siebie cystern, powiązanych układem stabilizujących mikrotubul. Lokuje się on najczęściej wokół jądra lub towarzyszy biegunowi wydzielniczemu sąsiadującemu z kanalem żółciowym włosowatym. W pobliżu rozdętych, obszernych cystern, znajdują się duże wakuole zawierające materiał natury lipidowej – VLDL. W jego skład wchodzi: cholesterol, fosfolipidy, trójglicerydy syntetyzowane w siateczce śródplazmatycznej gładkiej oraz apoproteiny B, C i E powstające na rybosomach siateczki szorstkiej.

W pobliżu diktiosomów aparatu Golgiego, siateczki gładkiej, a zwłaszcza w bezpośrednim otoczeniu kanala żółciowego włosowatego, obserwuje się wysoce zmienną, podlegającą także wahaniom dobowym i sezonowym, liczbę heterogennych pod względem wielkości i zawartości pęcherzyków lub wakuoli. Część z nich jest drobna, jednolicie gęsta elektronowo i nie zawiera żadnych trawionych substancji lub struktur – są to lizosomy pierwotne. Inne, znacznie większe i zawierające w macierzy resztki trawionych struktur lub substancje pochodzenia egzogenego, to lizosomy wtórne. Jeszcze inne, także znacznych rozmiarów, cechujące się zanikającą aktywnością enzymów wskaźnikowych, w tym AcP oraz zaawansowanym etapem trawienia sfagocytowanych substancji, to ciała reszkowe. W przeciętnej komórce wątrobowej liczbę lizosomów ocenia się na 180–300 sztuk. Wykazują one (jak również aktywność AcP) znaczną regionalizację rozmieszczenia w gronku, koncentrując się w hepatocytach stref III.

Hepatocyty zlokalizowane w strefie III gronek gromadzą także większą niż w pozostałych strefach liczbę peroksysomów – ok. 200 w jednym hepatocycie. Te niewielkie, o średnicy od 0,1 do 1,5 μm struktury, w swej

ziarnistej macierzy u pewnych gatunków zwierząt, np. szczurów, zawierają nukleoidy (rdzenie) o naturze pseudokrystalicznej. Owe rdzenie gromadzą oksydazę mocznową – jeden z enzymów przemian puryn. Inne z enzymów zawartych w peroksysomach, jak oksydaza L- -hydroksykwasowa i oksydaza L-aminokwasowa, uczestniczą w generowaniu nadtlenu wodoru, przemianach alkoholu etylowego, metylowego i formaldehydu. Z kolei katalaza i peroksydaza glutationowa gwarantują metabolizację związków wolnorodnikowych, w tym nadtlenu wodoru. Struktury te są także ważnym centrum wątrobowej glukoneogenezy oraz -oksydacji kwasów tłuszczowych.

Mitochondria hepatocytów należą do mitochondriów grzebieniastych o przeciętnym poziomie rozbudowy blaszki wewnętrznej. Liczebność i średnica tych organeli w komórkach mięsnych poszczególnych stref gronek jest istotnie zróżnicowana. I tak w strefie I są one duże, owalne, a ich liczba kształtuje się na poziomie ok. 800 na komórkę. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w tejże strefie ma poziom maksymalny. W strefie III gronek hepatocyty gromadzą znacznie więcej, ok. 1200–2000 drobnych i okrągłych mitochondriów, a aktywność dehydrogenazy bursztynianowej ma słabsze nasilenie. Aktywność mitochondriów w sposób skorelowany z siateczką śródplazmatyczną szorstką podlega fluktuacjom dobowym i sezonowym. Lata siedemdziesiąte i osiemdziesiąte 20. wieku dostarczyły argumentów na rzecz przebiegu elektronów pomiędzy łańcuchami transportu elektronów mitochondriów i siateczki poprzez zawarte w obu organelach cytochromy b5. Ma to szczególne znaczenie w warunkach wzmożonego obciążenia hepatocytów związkami toksycznymi [9, 16].

2.2. Heterogenność hepatocytów

Heterogenność hepatocytów w gronku wątrobowym ma zarówno wymiar morfologiczno-morfometryczny, jak i funkcjonalny [8]. Wyróżniamy hepatocyty towarzyszące triadom i tetradom wątrobowym (okołowrotne lub hepatocyty stref I gronek) oraz ułożone wokół żył centralnych (centrolobularne lub stref III gronek). Hepatocyty rozmieszczone w strefach II na ogół dysponują pośrednimi cechami strukturalnymi i funkcjonalnymi w stosunku do dwóch uprzednio wymienionych. Hepatocyty zawarte w strefach III gronek są większe, dysponują rozbudowaną siateczką śródplazmatyczną gładką (21 600 μm^2), większą liczbą drobnych mitochondriów, gromadzą w cytoplazmie barwniki, substancje zapasowe, w tym glikogen oraz związki tłuszczowe. Hepatocyty stref I są natomiast znacznie mniejsze, a siateczka gładka jest słabiej rozwinięta (ok. 15 700 μm^2). Mniej liczne, większe mitochondria o kształtach wydłużonych, cechują się pomnożoną liczbą grzebiń i powiększoną przestrzenią macierzy.

W strefach I dominują procesy regeneracji, syntezy i rozpadu białek, glukoneogenezy, syntezy mocznika, kwasów żółciowych, wytwarzania energii na drodze tlenowej i beztlenowej. W strefach III są natomiast skoncentrowane przemiany ksenobiotyków i substratów endogennych, magazynowanie substancji zapasowych, procesy glikogenolizy, gromadzenia i uwalniania barwników oraz kwasów żółciowych [2].

W latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych 20. wieku pojawiły się wątpliwości co do zasadności sztywnego wyodrębnienia w gronku trzech stref funkcjonalnych. Owe wątpliwości znalazły potwierdzenie w zasięgu i zmienności rozmieszczenia w gronku aktywności wielu enzymów wskaźnikowych, w świetle nowych faktów opisujących angioarchitekturę krążenia wątrobowego itp. [11]. Podział gronka na trzy stabilne, uporządkowane pod względem określonych cech strefy, stał się zbyt statyczny i nie uwzględniał działania lokalnych czynników regulacyjnych, które w istotny sposób rzutują na aktywność hepatocytów i współdziałających z nimi komórek NPC. Stało się wówczas oczywiste, że heterogenność strukturalna, morfometryczna i biochemiczna hepatocytów zależna jest od wielu różnych czynników, z których najważniejszymi są:

- zarówno wektorowy, jak i oboczny przepływ krwi narzucający określone parametry stężenia tlenu, substratów, kofaktorów, metabolitów w poszczególnych strefach gronka;
- odmienny poziom zróżnicowania hepatocytów z różną liczbą i dostępnością receptorów kształtujących ekspresję genów;
- lokalna zdolność komórek wątrobowych i NPC do wydzielania auto- i parakrynowego szeregu cytokin i czynników wzrostowych modyfikujących ich funkcję [12, 13, 14, 15].

3. Komórki nieparenchymalne wątroby (NPC)

3.1. Komórki Browicza-Kupffera

Komórki Browicza-Kupffera należą do układu fagocytów jednojądrzastych cechujących się ustabilizowaną, wewnątrznaczyniową lokalizacją. Wśród komórek NPC zajmują pozycję wyjątkową. Kontaktują się one zarówno z komórkami śródbłonkowymi naczyń zatokowych, jak i z hepatocytami, komórkami gwiaździstymi Ito i ziarnkowymi, kierując swe długie wypustki poprzez pory do przestrzeni Dissego [10]. Nie wytwarzają bezpośrednich, strukturalnych połączeń z innymi komórkami NPC i wątrobowymi. Stanowią około 20% wszystkich NPC, a ich liczebność może ulec pomnożeniu drogą rekrutacji monocytów cyrkulujących we krwi. Tak się dzieje w wypadku narastania procesów zapalnych. Makrofagi wątrobowe stanowią 80% puli wszystkich makrofagów

tkankowych [10]. W wątrobie w stanie homeostazy są niewielkie i wrzecionowate. Posiadają duże, owalne, mocno barwiące się hematoksyliną jądro komórkowe. Wokół niego lokuje się słabo wysycona barwnikiem, kwasochłonna cytoplazma, ze skupieniami zasadochłonnych ziarnistości. Obraz zmienia się w po zadziałaniu bodźca toksycznego czy zapalnego. Wówczas powiększają się, zmieniają kształt na gwiaździsty, a błona jądrowa wytwarza rozległe inwaginacje. Na elektronogramach komórki Browicza-Kupffera przewyższają wówczas swoimi rozmiarami komórki śródbłonkowe. Cytoplazmę wypełniają, powiązane ze sobą, pakiety krótkich cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz położone w bezpośrednim sąsiedztwie wolne rybosomy oraz polisomy. Blisko 13–20% powierzchni cytoplazmy zajmują diktiosomy aparatu Golgiego, a zwłaszcza bogato reprezentowana i heterogenna populacja lizosomów pierwotnych, wtórnych, ciałek wielopęcherzykowych oraz resztkowych, w których lokalizuje się 50% wątrobowej aktywności AcP. W pobliżu plazmolemy lokuje się także liczne endosomy i pęcherzyki pinocytarne. Wypustki i sfałdowania błony plazmatycznej makrofagów cechuje zdolność do wykonywania ruchów wynikających z oddziaływań pomiędzy błoną, cytoszkieletem oraz macierzą pozakomórkową. Błonę pokrywa 40–60 m glikokaliks, na który składają się oligosacharydy powiązane z lipidami oraz białkami integralnymi i powierzchniowymi błony. Glikokaliks ułatwia bezpośrednie związki pomiędzy hepatocytami i NPC typu przylegania, a także jest miejscem lokacji szeregu niezmiernie ważnych alloantygenuów oraz receptorów. Między innymi na powierzchniach błon komórek Browicza-Kupffera znajdują się glikoproteidowe produkty zespołu genów chromosomu 6, zwane głównym układem zgodności tkankowej MHC, zarówno klasy I, jak i II. Nadaje on makrofagom wątrobowym rolę komórek APC [23]. Obecność w glikoproteidowej otoczce komórek Browicza-Kupffera CD16 oraz receptorów dla układu dopełniacza, jak CR1(CD35), CR3 (CD11b, CD18), CR4 (CD11c, CD18), C5aR, otwiera możliwość receptorowej fagocytozy antygenów opłaszczonych przeciwciałami. Z kolei ekspresja CD4 powoduje, że makrofagi stają się komórkami tarczowymi dla wirusa HIV.

Gronko wątrobowe komórki Browicza-Kupffera, podobnie jak i hepatocyty, cechuje heterogenność strukturalna i funkcjonalna. I tak, w strefach I są one zazwyczaj liczniejsze, większe i posiadają wyższą aktywność enzymów lizosomalnych. W miarę przesuwania się w kierunku strefy II i III ich liczba oraz rozmiary maleją, wzrasta natomiast aktywność cytotoksyczna w stosunku do komórek nowotworowych. Podłożem cytotoksyczności jest wzmożone uwalnianie wolnych rodników tlenowych, w tym anionorodnika ponadtlenkowego i jonu hydroksylowego, uwalnianie TNF oraz niektórych proteaz lizosomalnych. Zasadniczą rolę w tym procesie

przypisuje się także IL-1 i receptorowi dla tej cytokiny, którego ilość wzrasta autoregulacyjnie na powierzchni makrofagów podlegających aktywacji.

Obok roli fagocytarnej Komórki Browicza-Kupffera pełnią niezwykle rozległe funkcje wydzielnicze [22]. Powstają bowiem na ich terenie substancje o ciężarach cząsteczkowych od 32D-anionorodnik ponadtlenny do 440000D – fibronektyna. Makrofagi wątrobowe produkują i uwalniają:

1. hormony peptydowe – IL-1, IL-6, IL-8, TNF, INF, tymozynę 4 oraz endoteliny;
2. czynniki wzrostowe – HGF, PDGF, FGF, TGF, G-CSF, GM-CSF;
3. składniki klasycznej i alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza C1g, C2, C3, C4, C5; czynniki B, D;
4. reaktywne nadtlenki;
5. enzymy: proteazy (elastaza, kolagenaza), lipazy (fosfolipaza A2), glukozaminidazy (lizozym), hydrolazy lizosomalne (proteazy, fosfatazy, glikozydazy – (deoksy- i rybonukleazy));
6. inhibitory enzymów i cytokin;
7. białka odpowiedzialne za przyleganie (adhezję, adherencję), jak fibronektyna;
8. białka wiążące metale – metaloproteiny, transferyna, transkobalamina;
9. białka wiążące lipidy – apoproteina E;
10. bioaktywne oligopeptydy – glutation;
11. produkty lipo- i cyklooksygenacji kwasu arachidowego – LTB₄, LTD₄ i PGE₁, PGF₂, PGD₂;
12. pochodne puryn i pirymidyn;
13. czynniki koagulacyjne – aktywator i inhibitor plazminogenu, inhibitor plazminy, PAF.

Pomiędzy komórkami Browicza-Kupffera a pozostałymi NPC oraz hepatocytami ukształtowana jest sieć powiązań strukturalnych i funkcjonalnych realizowanych poprzez wydzielane substancje oraz receptory na powierzchniach błon współpracujących komórek. Komórki Browicza-Kupffera dysponują rozbudowanym systemem dwustronnych powiązań z komórkami gwiazdzistymi. Owe powiązania zapewniają ze strony makrofagów PDGF, TGF, IL-6 i IL-8. Ze strony komórek Ito rolę wiodącą spełnia M-CSF [18]. Tak więc, z jednej strony makrofagi w sytuacji urazu wątroby o charakterze toksycznym, metabolicznym czy immunologicznym wzbudzają proliferację komórek Ito i ich transformację fenotypową w komórki przejściowe, a następnie miofibroblasty, to z drugiej komórki Ito dzięki syntezie i uwolnieniu M-CSF stymulują proliferację i różnicowanie makrofagów wątrobowych [18].

3.2. Komórki gwiazdziste (komórki Ito)

W piśmiennictwie znanych jest kilkanaście terminów odnoszących się do wyżej wymienionych komórek. W 1986 r. uznano, iż termin „komórki gwiazdziste” lub

„komórki Ito”, honorujący nazwą ich odkrywcę, jest najbardziej właściwy. Oceny morfologiczne oraz pomiary morfometryczne wskazują, iż w wątrobie gryzoni populacja komórek gwiazdzistych kształtuje się na poziomie od 5 do 10% wszystkich komórek narządu [25]. U ludzi w zdrowej wątrobie na 100 hepatocytów przypada przeciętnie od 7–15 wspomnianych komórek [27]. Stanowią one aż 97% wszystkich komórek NPC obecnych w przestrzeniach Dissego. Dysponują dwoma typami wypustek, które z jednej strony zbiegają do hepatocytów (wypustki intersinusoidalne), z drugiej do naczyń zatokowych (wypustki subendotelialne). Wspomniane wypustki powiązane są z hepatocytami i śródbłonkiem za pomocą płamek przylegania oraz złączy szczelinowych. Ta forma związków komórek gwiazdzistych z komórkami śródbłonka naczyniowego oraz mięsaszowymi wskazuje na ich rolę aktywnego pośrednika uczestniczącego w wymianie substratów lub produktów, a także w przekazaniu informacji pomiędzy nimi [6]. Liczebność komórek gwiazdzistych w gronkach wątrobowych jest zmienna, i jak się wydaje, skorelowana z zawartością witaminy A. Zmniejszenie stężenia witaminy A, które ma miejsce w toksycznym uszkodzeniu narządu wywołanym przez czterochlorek węgla lub alkohol, wiąże się z drastyczną redukcją liczby komórek Ito [10]. Identyfikacja komórek gwiazdzistych na szczepku mikroskopii świetlnej nie nastręcza kłopotów. Wykryć je można metodą impregnacji chlorkiem złota, wykorzystując autofluorescencję witaminy A lub lokalizując immunocytochemicznie desminę [5]. Na elektronogramach zwraca uwagę obecność w cytoplazmie zróżnicowanej wielkości obłonionych lub nieobłonionych kropli lipidowych (1–3 μm) gromadzących witaminę A w postaci estrów retinylu. Obok nich w cytoplazmie występują nieliczne grzebiaste mitochondria, średnio rozwinięta szorstka i gładka siateczka śródplazmatyczna oraz rozbudowane struktury aparatu Golgiego [19]. W poszczególnych strefach gronków wątrobowych liczba komórek Ito wydaje się zbliżona. Uderza natomiast ich heterogenność strukturalna. I tak, w strefach I gronków, są one zazwyczaj ubogie w krople tłuszczu oraz posiadają krótkie wypustki cytoplazmatyczne, w strefach III cechuje je nieregularność obrysów, brak włókienek desminowych i kropli tłuszczowych w cytoplazmie. W strefach II posiadają natomiast duże rozmiary, rozbudowane wypustki cytoplazmatyczne oraz znaczną zawartość tłuszczu i desminy.

Komórki gwiazdziste w stanie strukturalnego i metabolicznego „spokoju” wątroby zawierają duże ilości kropli lipidowych oraz uczestniczą w procesach magazynowania retinoidów i ich utleniania do kwasu retinowego, co umożliwia ADH. Retinoidy są odpowiedzialne za stabilizację ich stanu spoczynkowego, inhibicję syntezę kolagenu i innych białek macierzy pozakomórkowej. Komórki gwiazdziste wytwarzają najwięcej substancji pozakomórkowej, współpracując w tej mierze z hepato-

cytami i komórkami Browicza-Kupffera [7]. Produkują one także metaloproteinazy i ich inhibitory, regulując w ten sposób rozkład macierzy pozakomórkowej.

Ocenia się, iż około 80–90% wątrobowej witaminy A i jej metabolitów magazynowane jest w komórkach gwiazdzistych, które ją pozyskują z komórek wątrobowych lub bezpośrednio z osocza za pomocą wyspecjalizowanych białek receptorowych – RDP. Z kolei retinol w komórkach docelowych w obrębie cytosolu jest utleniany do kwasu retinowego i wywiera wpływ na aktywność procesów transkrypcyjnych poprzez związanie się z receptorami jądrowymi RAR [17].

Pobudzenie komórek gwiazdzistych łączy się z głęboką przebudową ich struktury i funkcji. Z sytuacją taką mamy do czynienia np. w momencie uszkodzenia wątroby poprzez substancje toksyczne, leki, wirusy, antygeny czy czynniki metaboliczne. Wzmoczona rekrutacja monocytów, granulocytów, aktywacja komórek Browicza-Kupffera, przyjmująca formę wzmoczonego wyrzutu cytokin oraz produkcja białek ostrej fazy przez hepatocyty sprawiają, iż komórki gwiazdziste szybko namnażają się, powiększają swą średnicę oraz tracą zdolność do magazynowania witaminy A [5]. Przekształcając się one następnie w miofibroblasty intensywnie produkujące kolagen typu I, III, IV, VI, fibronektynę, lamininę, entaktyny, tensyny, ondulinę oraz inne glikoproteiny i proteoglikany [4]. W miarę postępu procesów fenotypowej transformacji w miofibroblasty w przestrzeniach Dissego, a także w innych fragmentach wątroby, powstają przegródki łącznotkankowe oraz rozbudowują się w pobliżu naczyń zatokowych błony podstawne, które zakłócają efektywność wymiany substratów, hormonów, neuromediatorów oraz innych produktów pomiędzy krwią a hepatocytami i komórkami NPC [5]. Postępuje kapilaryzacja naczyń włosowatych polegająca na zmniejszeniu liczby i średnicy porów w komórkach śródbłónka naczyń [26]. Silnym induktorem omawianej transformacji jest etanol oraz jego podstawowy metabolit – aldehyd octowy. Miofibroblasty uwalniają TGF- β i TGF- β 1. Ostatnia z wymienionych cytokin urasta do najpoważniejszego auto- i parakrynowego czynnika regulującego włóknienie wątroby, działającego zarówno potęgуюco na syntezę kolagenu, jak i innych białek macierzy pozakomórkowej oraz hamując na ich rozpad na drodze blokowania aktywności proteaz i metaloproteinaz.

Komórkom gwiazdzistym przypisuje się także niezwykle eksponowaną rolę w regulacji przepływu krwi przez narząd [6]. Warunkuje to zarówno obecność adrenergicznych receptorów α 1 na powierzchni hepatocytów, jak i ścisłe powiązanie komórek Ito z naczyniami włosowatymi zatokowymi oraz mięszkowymi poprzez wypustki i złącza szczelinowe. Noradrenalina i ATP docierające do receptorów adrenergicznych, a także wzmoczona ekspresja białek adhezyjnych N-CAM, uruchamia w komórkach Ito syntezę PGF-2 α oraz PGD2. Komórki Ito uczest-

niczą zatem w magazynowaniu i uwalnianiu retinoidów, regulują wydzielanie wielu mediatorów i chemoatraktantów i kontrolują przepływ krwi [6]. Miofibroblasty wpływają natomiast na poziom włóknienia.

3.3. Komórki śródbłónkowe

Komórki śródbłónkowe wywodzące się z mezenchymy posiadają kształt wydłużonych wieloboków o wysokości 10–15 μ m i długości 20–50 μ m. Żyją około 90–120 dni [24]. Ich jądra lokują się w nagromadzeniach cytoplazmy, która obok innych nielicznych struktur, zawiera jasne pęcherzyki transportujące różnorodne substancje przez ścianę komórki albo drogą transportu fizycznego, albo drogą receptorową z wykorzystaniem własnych zasobów energetycznych. Z kolei obszerne 100 nm pory są szlakiem wymiany makrocząsteczek, z wyjątkiem elementów morfotycznych i chylomikronów, pomiędzy krwią i przestrzenią Dissego. Średnica porów i ich ugrupowań zwanych blaszkami sitowymi jest nieustabilizowana dzięki silnie rozbudowanej strukturze cytoszkieletu. Ów cytoszkielet modyfikuje także wysokość komórek, co w istotny sposób wpływa na wielkość strumienia krwi przepływającego wzdłuż beleczek wątrobowych.

Na wolnych powierzchniach śródbłónka zlokalizowany jest stosunkowo gruby płaszcz glikozaminoglikanowy wiążący wodę, proteoglikany, wychwytyjący czynniki wzrostowe. Z kolei obecność na powierzchni śródbłónki białek adhezyjnych, selektyny E, P i CAM-1, stwarza dogodne przesłanki nie tylko do przylegania komórek, lecz także diapedezy.

Komórki śródbłónkowe są producentem wielu hormonów, czynników wzrostowych i cytokin. Produkują całą rodzinę prostaglandyn z PGI₂ na czele, która rozszerza naczynia i przeciwstawia się agregacji płytek krwi. Syntezują i uwalniają endoteliny, które obkurczają mięśniówkę gładką naczyń. Cechują się także silnym działaniem mitogennym – angioneogenetycznym. W komórkach śródbłónkowych dokonuje się syntaza tlenków azotu i to zarówno jej formy konstytutywnej, jak i podlegającej indukcji. Syntaza generuje z argininy tlenki azotu, które z łatwością przenikają do warstwy mięśniowej tętniczek i aktywują cyklazę guanylową. Powstały cGMP, obniżając stężenie jonów wapnia w cytozolu, doprowadza do rozkurczu warstwy mięśniowej naczyń.

Śródbłonek naczyń wątrobowych, obok nerek i płuc, zawiera konwertazę angiotensynową, enzym proteolityczny, dla którego substratem jest angiotensyna I powstała z angiotensynogenu. Peptyd ten dysponuje silnym, aczkolwiek krótkotrwałym działaniem presyjnym na łożysko naczyniowe. Cytokiny uwalniane przez aktywne makrofagi wątrobowe pobudzają syntezę IL-1, IL-6, TNF- α w komórkach śródbłónkowych. Na powierzchni ich błon umiejscowione są receptory dla histaminy, bradykininy, substancji P, acetylocholino i innych. Po-

wiązanie z receptorami wiąże i uruchamia aktywność konstytutywnej formy syntazy tlenku azotu. Śródbłonki poprzez PGD2 i PAF regulują poziom glikogenolizy w hepatocytach. W warunkach toksycznego uszkodzenia komórek Browicza-Kupffera przejmują one na siebie funkcję immunofagocytarną.

3.4. Komórki ziarnkowe

Komórki ziarnkowe stanowią kolejną frakcję komórek NPC, na którą składają się w 36% limfocyty NK-T, w 25% NK i w 25% TCR⁺. Komórki NK cechuje naturalna cytotoksyczność. Są odrębną klasą limfocytów charakteryzujących się spontaniczną gotowością do zabijania komórek docelowych, w tym nowotworowych lub transformowanych wirusem. Likwidacja komórek docelowych odbywa się bez restrikcji w zakresie MHC. Odgrywają one ponadto poważną rolę immunoregulacyjną. NK lokują się przede wszystkim w krwi obwodowej (ok. 10% cyrkulujących limfocytów), a także w wątrobie, płucach, śledzionie i błonie śluzowej jelit. Do chwili obecnej nieznane są mechanizmy wpływające na ich obieg w organizmie oraz długość ich życia. W wątrobie lokują się w przestrzeniach Dissego oraz w naczyniach zatokowych. W tych ostatnich, zwłaszcza po indukcji IL-2, wykazują ścisłe związki z komórkami Browicza-Kupffera. Wspomniana cytokina jest silnym induktorem proliferacji, a także cytotoksyczności obu wymienionych typów komórek NPC. Błona plazmatyczna komórek NK wytwarza liczne mikrokosmki i sfaldowania. W ich obrębie zlokalizowano szereg antygenów powierzchniowych: CD2, CD8, CD11, CD16, CD56. Obecność receptora CD16 pozwalającego na wiązanie antygenów opłaszczonych IgG umożliwia im uczestnictwo w procesie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał ADCC. Część centralną komórek NK zajmuje duże jądro komórkowe kształtu nerkowatego z rozbudowaną heterochromatiną. W jego obrębie obserwuje się obszerne, pojedyncze jąderko. Znaczną powierzchnię cytoplazmy zajmują azurofilne ziarnistości, które podzielono na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym na trzy klasy: średnie i duże ziarnistości, duże wakuole oraz wakuole o mniejszej średnicy. Lokują się w nich enzymy lizosomalne, peroksydazy, perforyny i granzymy. Komórki NK wywodzą się z prekursorów szpikowych innych niż dla limfocytów B i T, a na ich pojawienie się wpływa IL-2, INF- γ i INF- α oraz lokalne czynniki środowiskowe. Zlokalizowane w wątrobie komórki NK zachowują zdolność do proliferacji. Najsilniejszym czynnikiem wzrostowym, a zarazem wzmagającym ich cytotoksyczność, jest IL-2.

4. Unaczynienie wątroby i krążenie limfy

W każdej minucie do wątroby dociera 1500 ml krwi, z czego 1200 ml pochodzi z żyły wrotnej, a reszta z tętnicy wątrobowej i gałązek tętnicy żołądkowej i żołądkowo-dwunastniczej. To, co w istotnym stopniu wyróżnia krążenie krwi w wątrobie w stosunku do innych narządów, sprowadza się do kilku cech:

1. narząd ten posiada zarówno unaczynienie odżywcze, jak i czynnościowe;
2. na szczeblu naczyń włosowatych oba unaczynienia łączą się, a krew ulega przemieszaniu;
3. tętniczki międzyzrazikowe i okołozrazikowe mają charakter naczyń oporowych;
4. żyły międzyzrazikowe oraz venule końcowe prowadzące krew do naczyń zatokowych nie zawierają w swej ścianie komórek mięśniowych, a jedynie włókna kolagenowe i elastyczne o układzie okrężnym;
5. naczynia włosowate omywające beleczyki wątrobowe mają charakter naczyń zatokowych, a w wypustkach komórek śródbłonkowych obecne są 100 nm pory ugrupowane w blaszki sitowe;
6. naczynia żylne o średnicy powyżej 400 nm odprowadzające krew w kierunku żył wątrobowych posiadają okrężną warstwę miocytów gładkich i pełnią funkcję oporową;
7. naczynia żylne na całym przebiegu nie posiadają zastawek;
8. w warunkach homeostazy narządu ok. 75% naczyń włosowatych zatokowych wątroby nie uczestniczy w krążeniu.

Wnikające przez wnękę naczynia dzielą się na tętnice i żyły płatowe, segmentowe, biegnące w osi gronek złożonych. W gronkach prostych jako tętniczki i żyły międzyzrazikowe oraz okołozrazikowe wlewają krew do naczyń zatokowych. Część krwi tętniczej zaopatruje także kanalik żółciowy międzyzrazikowy poprzez utworzoną sieć naczyń włosowatych. Z kolei zbiegające się w centrum zrazika naczynia włosowate zatokowe przekazują krew do szerokich, 45 μ m żył centralnych, skupiających pod śródbłonkiem pewną liczbę włókien retikuliny o układzie okrężnym. Żyły centralne wlewają krew do żył podzrazikowych, zbiorczych i wątrobowych, które uchodzą do żyły głównej dolnej.

Wątroba jest znacznym producentem limfy. Chłonka ujawnia się na poziomie przestrzeni Dissego, a najmniejsze naczynia limfatyczne zlokalizowane są w tkance łącznej międzyzrazikowej przestrzeni bramno-żółciowych. Drenaż chłonki odbywa się poprzez dwie sieci chłonne: powierzchnną i głęboką. Pierwsza z wymienionych zbiera limfę ze zrazików posadowionych obwodowo w narządzie i przekazuje je do węzłów chłonnych trzewnych, mostkowych, śródpiersiowych i lędźwiowych. Sieć głęboka drenaży mięśnierzętkową wątroby położoną w centrum narządu, a limfa kierowana jest naczyniami

limfatycznymi wzdłuż rozgałęzień żyły wrotnej lub żył wątrobowych odpowiednio do węzłów trzewnych lub śródpiersiowych.

5. Drogi żółciowe

Kanaliki żółciowe włosowate o średnicy 0,5–1 μm są początkiem dróg żółciowych. Budują je hepatocyty składające się na beleczkę wątrobową. Błony plazmatyczne bieguna wydzielniczego komórek miąższowych, stanowiące ograniczenie wspomnianych kanalików, wykazują aktywność AP, ATP-azy Mg^{+2} i 5-NT. Sieć kanalików włosowatych przechodzi na obwodzie zrazików w kanalikach żółciowe Heringa, które są wysłane częściowo nabłonkiem jednowarstwowym sześciennym dysponującym mikrokosmkami, a w cytoplazmie gromadzącym wakuole tłuszczowe, pojedyncze mitochondria oraz liczne elementy ugrupowań siateczki śródplazmatycznej gładkiej i aparatu Golgiego. Pozostałą część ściany tworzą hepatocyty. Kanalik Heringa przekazują żółć do kanalików żółciowych międzyzrazikowych wchodzących w skład triad wątrobowych. Te z kolei wysłane są początkowo nabłonkiem jednowarstwowym sześciennym, a w miarę wzrostu średnicy jednowarstwowym walcowatym, leżącym na błonie podstawnej dającej silny odczyn na mukopolisacharydy. Elektronogramy wspomnianych komórek ujawniły w cytoplazmie obecność licznych kropli lipidowych, ziarnistości glikogenowych, mitochondriów z długimi grzebieniami, silnie rozbudowaną siateczką gładką i mnogie diktiosomy aparatu Golgiego. Na powierzchni wolnej komórek zawarte są liczne mikrokosmki. Znaczne sfałdowania zidentyfikowano także na ich powierzchniach bocznych i podstawnych. W obrębie nabłonka kanalików żółciowych międzyzrazikowych zlokalizowano także gęste elektronowo komórki wstawkowe. Przypuszczalnie stanowią one pulę komórek rezerwowych, odpowiedzialnych za regenerację. Kanalik międzyzrazikowe, a następnie coraz większe przewody żółciowe na wysokości przegrody poprzecznej, tworzą prawy i lewy przewód wątrobowy, które zlewają się, a następnie, łącząc z przewodem pęcherzykowym, tworzą przewód żółciowy wspólny o długości 8–12 cm uchodzący do dwunastnicy na brodawce Vatera. W przewodzie wątrobowym wspólnym istotnemu pomnożeniu ulega mięśniówka gładka, która przyjmuje postać pełnej warstwy zawierającej miocyty o układzie okrężnym. W ujściu przewodu do dwunastnicy obecne są dwa silne zwieracze.

ZAŁĄCZNIK 1. SKOROWIDZ SKRÓTÓW

AcP	fosfataza kwaśna
tlparADCC	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
SMA	aktyna miocytów gładkich
AMP	adenozyno-monofosforan
APC	komórka prezentująca antygen
ATP	adenozynotrójfosforan
B	czynnik B dopełniacza
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan
C1q, C2, ...	czynniki dopełniacza
CD2, CD4, ...	kompleksy różnicowania
CEA	antygen karcinoembrionalny
CK-7, CK-19	cytokeratyny
CR	receptor dla dopełniacza
CR1	receptor dla dopełniacza (CD35)
CR3	receptor dla dopełniacza (CD11b, CD18)
CR4	receptor dla dopełniacza (CD11c, CD18)
C5aR	receptor dla dopełniacza C5a
CSF	czynnik stymulujący powstawanie koloni
G-CSF	czynnik stymulujący powstanie kolonii granulocytów
GM-CSF	czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów i makrofagów
M-CSF	czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów
CYP 450	cytochrom P-450
D	czynnik D dopełniacza
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
ET1, ET2, ET3	endoteliny
FcR	receptor dla fragmentu Fc przeciwciała
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów
GEP	układ żołądkowo-jelitowo-trzustkowy
GMP	guanozynomonofosforan
c-GMP	cykliczny guanozynomonofosforan
HGF	czynnik wzrostu hepatocytów
HIV	ludzki wirus niedoboru immunologicznego
ICAM	cząsteczka adhezji międzykomórkowej
Ig	immunoglobulina
IgA	immunoglobulina klasy IgA
IgG	immunoglobulina IgG
IL1, IL2, ...	interleukiny
INF	interferon

ZAŁĄCZNIK 1. SKOROWIDZ SKRÓTÓW (cd.)

INF , ,	interferony , ,
LAF (CD58)	integryna odpowiedzialna za adhezję pomiędzy komórkami
LGL	duży ziarnisty limfocyt
LT	leukotrien
LTB4	leukotrien LTB4
faultLTD4	leukotrien LTD4
MHC-I, II	główny układ zgodności tkankowej klasy I i klasy II
N-CAM	cząsteczka adhezji komórek nerwowych
NK	komórka cytotoksyczna NK
OV-6	antygen obecny na powierzchni komórek owalnych oraz cholangiocyto
PAF	czynnik aktywujący płytki krwi
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu
PGE	prostaglandyna E
PGE2	prostaglandyna E2
PGF2	prostaglandyna F2
PGD2	prostaglandyna D2
PGI2	prostaglandyna I2, prostacyklina
RAA	układ renina-angiotensyna-aldosteron
mRAR	receptor kwasu retinowego
RNA	kwas rybonukleinowy
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioksyna
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu
TGF , 1, 2, 3	transformujące czynniki wzrostu , 1, 2, 3
TNF	czynnik martwicy nowotworu
TXA2	tromboksan A2
