

Received: 2009.02.12  
Accepted: 2009.06.01  
Published: 2009.07.10

## Rola komórek gwiaździstych w procesie alkoholowego włóknienia wątroby\*

### Role of stellate cells in alcoholic liver fibrosis

Krzysztof Plewka, Agnieszka Szuster-Ciesielska, Martyna Kandefor-Szerszeń

Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, UMCS w Lublinie

#### Streszczenie

Wiele chorób i czynników toksycznych uszkadza wątrobę powodując w niej trudne do odwrócenia zmiany. Procesy chorobowe toczące się w wątrobie prowadzą często poprzez włóknienie do jej marskości. Podstawowym wydarzeniem dla rozwoju włóknienia wątroby jest aktywacja komórek gwiaździstych (HSC). Są to komórki o morfologii zbliżonej do komórek nerwowych, lecz aktywowane, morfologicznie i funkcjonalnie przypominają fibroblasty. Aktywowane HSC wydzielają wiele substancji promujących aktywację pozostałych HSC, a także zaczynają wydzielać znaczne ilości białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), z których najważniejszy dla przebiegu włóknienia jest kolagen typu I. Aktywowane HSC wytwarzają również substancje blokujące aktywność enzymów proteolitycznych mogących rozkładać nadmiar ECM.

Za aktywację HSC i jej podtrzymanie są odpowiedzialne głównie cytokiny oraz stres oksydacyjny. Transmisja sygnałów aktywujących komórki gwiaździste odbywa się poprzez liczne kinazy. Najistotniejszymi z nich są: JNK, ERK1/2, p38, TAK-1, PKC, FAK, P3IK. Sygnały, uruchomione po związaniu receptorów na błonie komórkowej odpowiednim ligandem, poprzez cytoplazmę przekazywane są do jądra komórkowego, gdzie wpływają na aktywność czynników transkrypcyjnych, takich jak: Smad, AP-1 czy NF- $\kappa$ B. Powodują one zmiany w transkrypcji genów, wpływając na morfologię i funkcje komórki. Pojawiają się czynniki świadczące o stopniu aktywacji HSC ( $\alpha$ SMA, kolagen typu I, TIMP-1) oraz nasilające proces chorobowy (PDGF, TGF- $\beta$ ).

Mimo obszernej wiedzy na temat mechanizmów związanych z rozwojem włóknienia wątroby wiele jeszcze pozostało do wyjaśnienia, a co najważniejsze dotąd nie opracowano skutecznej terapii. Dlatego też niezbędne są dalsze badania i pogłębienie wiedzy na temat tego problemu.

#### Słowa kluczowe:

aktywacja komórek gwiaździstych • włóknienie wątroby • TGF- $\beta$  • Smad • MAPK

#### Summary

Many different diseases and toxins can cause liver damage, which is difficult to treat and often leads to the development of liver fibrosis or even cirrhosis. The key event in this process is the activation of hepatic stellate cells (HSCs). During such activation, HSCs undergo a dramatic transformation in morphology and behavior, changing from a neuronal-like to a fibroblast-like morphology. After activation, HSCs increase their proliferation rate and extracellular matrix (ECM) production. Overproduction of ECM, which contains mainly collagen type I, is a direct cause of liver disruption. HSCs also produce substances which inhibit protease activities, such as TIMPs, which enhance ECM deposition in the liver. On the molecular level, HSCs are activated by cytokines, growth factors, and oxidative stress, which are abundant in afflicted liver. These factors

\* Praca finansowana z grantu MNiSzW nr P05A 16929.

induce intracellular signals transmitted by many kinases, the most important of which are JNK, ERK1/2, p38, TAK-1, PKC, FAK, and P31K. Signals transmitted via these pathways change the activities of transcription factors such as Smad, AP-1, and NF- $\kappa$ B. This in turn causes changes in gene transcription and ultimately alters the whole cell's behavior and morphology. The cell begins the production collagen type I, TIMP-1, and  $\alpha$ SMA. Activated HSCs can sustain their own activation by producing growth factors such as PDGF and TGF- $\beta$ . Despite the vast knowledge about the mechanisms causing liver fibrosis and cirrhosis, there is still no effective cure. Further studies are therefore needed to solve this problem.

**Key words:** HSC activation • liver fibrosis • TGF- $\beta$  • Smad • MAPK

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=890342>

**Word count:** 6027

**Tables:** 1

**Figures:** 1

**References:** 56

**Adres autora:** mgr Krzysztof Plewka, Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: hurin22@wp.pl

**Wykaz skrótów:**  $\alpha$ CP – białko pokrywające  $\alpha$  (capping protein  $\alpha$ );  $\alpha$ -SMA –  $\alpha$  aktyna komórek mięśni gładkich ( $\alpha$  smooth muscles actin); AcALD – aldehyd octowy (acetaldehyde); ADH – dehydrogenaza alkoholowa (alcohol dehydrogenase); ALD – alkoholowa choroba wątroby (alcoholic liver disease); ALDH – dehydrogenaza aldehydowa (acetaldehyde dehydrogenase); AP-1 – czynnik transkrypcyjny (activator protein-1); APC – komórki prezentujące antygen (antigen presenting cells); ATF2 – czynnik aktywujący transkrypcję 2 (activating transcription factor-2); Atk – kinaza białkowa B (agammaglobulinemia tyrosine kinase); BTEB – czynnik transkrypcyjny (basic transcriptional element binding); C/EBP – białko wiążące i aktywujące CCAAT (CCAAT/enhancer binding protein); CBP/p300 – białko wiążące CREB i p300 (CREB binding protein and binding protein p300); COL1A – gen kolagenu alfa typu I (collagen I alpha 1 gene); COX-2 – cyklooksygenaza 2 (cyclooxygenase 2); CREB – czynnik transkrypcyjny aktywowany za pośrednictwem fosforylacji przez PKA (cAMP response element binding); CTGF – czynnik wzrostu tkanki łącznej (connective tissue growth factor); CYP2E1 – izoforma 2E1 cytochromu P-450; DDR – receptor domeny dyskoidynowej (discoidin domain receptor); ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix); EGF – endotelialny czynnik wzrostu (endothelial growth factor); ERK1/2 – kinazy aktywowane sygnałami zewnętrznymi (extracellular signal-regulated kinases); ET-1 – endotelina 1 (endothelin-1); FAK – kinaza adhezji miejscowej (focal adhesion kinase); FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); GFAP – fibrylarne kwaśne białko glejowe (glial fibrillary acid protein); GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); GPX – peroksydaza glutationu (glutathione peroxidase); GSH – glutation (glutathione); HAK – 4-hydroksy-2,3-alkenal; HBV – wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus); HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus); HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); HNE – 4-hydroksy-2-nonenal; HSC – ludzkie komórki gwiaździste (human stellate cells); IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin like growth factor); IL – interleukina (interleukin); I $\kappa$ B – inhibitor czynnika jądrowego  $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B); I $\kappa$ K – inhibitor kinazy  $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B kinase); JNK – kinaza N-końcowego odcinka c-Jun (c-Jun N-terminal kinase); KBK – komórki Browicza-Kupffera; KGF – czynnik wzrostu keratynocytów (keratinocyte growth factor); LBP – białko wiążące LPS (LPS binding protein); LPS – lipopolisacharyd (lipopolisaccharide); MAPK – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (mitogen-activated protein kinases); MAT – adenozylotransferaza metioniny (methionine adenosyltransferase); MCP-1 – białko przyciągające monocyty 1 (monocyte chemoattractant protein-1); M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (macrophage colony-stimulating factor); MDA – aldehyd dimalonowy (malondialdehyde); MEK – kinaza serynowo-treoninowa (mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase); MEOS – mikrosomalny system utleniania etanolu (microsomal ethanol oxidizing system); MFB – miofibroblasty (miofibroblasts);

**MKK** – kinaza kinazy MAP (mitogen-activated protein kinase kinase);  
**MMP** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinase); **MOK** – kinaza MOK (MOK kinase);  
**NAD** – dinukleotyd nikotynamidowy (nicotinamido dinucleotide); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **NLK** – kinaza nempodobna (nemo-like kinase); **PAF** – płytkowy czynnik aktywujący (platelet activating factor); **PAK** – kinaza serynowo-treoninowa (p21 activated kinase);  
**PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PDK-1** – kinaza zależna od fosfoinozytolu 1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase-1); **PGE2** – prostaglandyna E2 (prostaglandin E2); **PI-3K** – kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase);  
**PKA** – kinaza zależna od cAMP (cAMP-dependent protein kinase); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **PLCγ** – fosfolipaza C (phospholipase C); **PPARγ** – receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów (peroxisome proliferator-activated receptor); **Ras-GTP/GDP** – małe białko wiążące GTP lub GDP; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **RSK** – kinaza rybosomalna S6 (ribosomal S6 kinase); **SAM** – S-adenozyno-metionina (S-adenosyl methionine);  
**SEC** – zatokowe komórki nabłonkowe (sinusoidal endothelial cells); **SEK** – kinaza SAPK/ERK (SAPK/ERK kinase); **Sp-1** – stabilne białko 1 (stable protein 1); **STAT 3** – białko przekazujące informacje i aktywujące transkrypcję (signal transduction and activator of transcription); **SYN** – synaptofizyna (synaptophysin); **TAK-1** – kinaza odkryta w *Triticum aestivum* (*Triticum aestivum* kinase);  
**TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **TGF-βR** – receptor czynnika transformującego β (transforming growth factor β receptor); **TIMP-1** – tkankowy inhibitor proteaz 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1); **TLR** – receptory Toll-like (Toll-like receptors); **TNF** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor).

## 1. WPROWADZENIE

Komórki gwiaździste (human stellate cells – HSC), nazywane także komórkami Ito czy lipocytami, w prawidłowej wątrobie stanowią 1,4% jej objętości, wykazując mały potencjał podziałowy oraz niewielką liczebność w porównaniu z hepatocytami (3,6-6 HSC przypada na 100 hepatocytów). Komórki HSC są umiejscowione w przestrzeniach między hepatocytami a zatokowymi komórkami nabłonkowymi (sinusoidal endothelial cells – SEC), nazywanych przestrzeniami Dissego. Od ciał HSC odchodzą wypustki dendrytyczne o długości 20–30 μm penetrujące znaczną przestrzeń wątroby [60]. Spoczynkowe HSC przypominają wyglądem komórki nerwowe i skojarzenie to nie jest dalekie od prawdy, bowiem część źródeł literaturowych sugeruje, że HSC mają więcej wspólnego z ektodermalnymi komórkami nerwowymi niż z pozostałymi mezodermalnymi komórkami wątroby. HSC wykazują ekspresję markerów typowych dla komórek nerwowych, takich jak: filamenty fibrylarnych kwaśnych białek glijowych (glial fibrillary acid proteins – GFAP) [25,100], czy nestyna [100]. Udowodniono również u HSC ekspresję synaptofizyny (SYN) [25], glikoproteiny transbłonowej kontrolującej uwalnianie neuroprzebieżników w synapsach [2]. Ponadto, HSC znajdują się w bliskim kontakcie z zakończeniami nerwowymi [32,138]. Fakty te zdają się potwierdzać hipotezę, że HSC pośredniczą w kontroli ośrodkowego układu nerwowego nad funkcjami wątroby [25], lecz nie zostało to doświadczalnie udowodnione.

Głównym zadaniem HSC jest: wytwarzanie i degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej, regulacja ciśnienia krwi w naczyniach wątroby, wytwarzanie cytokin, prostaglandyn i czynników wzrostowych oraz magazynowanie witaminy A. Witamina ta jest przechowywana w cytoplazmatycznych kroplach tłuszczu bogatych w estry retinolu. Retinol w HSC stanowi 80% całej witaminy A przechowywanej w wątrobie [60].

HSC uczestniczą w odpowiedzi układu odpornościowego na infekcje w wątrobie jako komórki prezentujące antygeny (antigen presenting cells – APC). Hipotezę tę potwierdza to, że HSC wykazują ekspresję antygenów charakterystycznych dla APC, w tym MHC-I, MHC-II oraz CD1 [147]. Ponadto, HSC wytwarzają wiele cytokin i chemokin charakterystycznych dla APC, takich jak: IL-6, -8, -10 czy MCP-1 [88,94,121] oraz mają na powierzchni błony komórkowej TLR-4 (Toll-like receptor 4) [86,103], TLR-2 [102] i receptory dla fragmentu Fc przeciwciał umożliwiające endocytozę opłaszczonych przez immunoglobuliny antygenów [123]. Obecność tych elementów sprawia, że HSC ściśle współpracują z układem immunologicznym wątroby, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych.

W wyniku uszkodzenia wątroby lub w hodowli *in vitro* na podłożu plastikowym komórki gwiaździste ulegają aktywacji i zwiększają tempo podziałów komórkowych. Następnie zanikają krople cytoplazmatyczne zawierające witaminę A. Pojawia się natomiast ekspresja α-aktyny charakterystycznej dla komórek mięśni gładkich (α smooth muscles actin – αSMA). Transformacja HSC prowadzi do powstania komórek o fenotypie fibroblastyczno-mięśniowym (MFB – miofibroblasts) [60]. Dzięki obecności białka αSMA transformowane HSC uzyskują możliwość ruchu i migrują przyciągane chemotaktycznie przez komórki wydzielające w miejscu uszkodzenia PDGF i MCP-1 [93]. W wyniku aktywacji genów *COL1A* i *COL1A2* (gen kolagenu alfa typu I – collagen I alpha 1 gene) w miejscach uszkodzeń wątroby, HSC zaczynają syntetyzować kolagen typu I jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej. Nadmierne wytwarzanie ECM jest głównym powodem choroby włóknieniowej wątroby.

Aktywowane HSC wytwarzają nie tylko nadmierne ilości ECM, ale również wiele różnorodnych cytokin i chemo-

kin powodując lawinę sygnałów międzykomórkowych, która prowadzi do aktywacji dalszych HSC i w konsekwencji do nasilenia procesów chorobowych. Dlatego proces aktywacji i transformacji HSC uznany został za podstawowy w rozwoju włóknienia wątroby [116].

Włóknienie wątroby rozwija się pod wpływem długotrwałego jej uszkodzenia, a nieleczone prowadzi do marskości wątroby i w konsekwencji do upośledzenia jej funkcji w organizmie. Istnieje wiele przyczyn etiologicznych tego procesu: nadużywanie alkoholu, infekcje wirusowe (HCV, HBV), stłuszczenie wątroby, choroba autoimmunologiczna, zatrucia lekami, pasożyty, choroby metaboliczne (hemochromatoza, choroba Wilsona) oraz choroby dróg żółciowych. Mimo różnorodności czynników etiologicznych rozwój choroby jest bardzo podobny [49].

W prawidłowej wątrobie przestrzeń między komórkami wypełniają niewielkie ilości ECM o niskiej gęstości zawierającej wysoko usieciowany kolagen. Zadaniem tej macierzy zewnątrzkomórkowej jest tworzenie podpory dla komórek wątroby jak i pośredniczenie w przesyłaniu sygnałów między komórkami przez rozpuszczone w niej czynniki wzrostu czy inne cytokiny. W trakcie zmian włóknieniowych następuje przebudowa ECM na bardziej włóknistą, która nie spełnia funkcji pierwotnej ECM [49].

W zdrowym organizmie istnieją mechanizmy usuwające macierz zewnątrzkomórkową. Jest to cała rodzina enzymów zwanych metaloproteinazami macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metaloproteinase – MMP) odpowiadających za trawienie ECM. MMP są wytwarzane w komórkach w postaci nieaktywnej, a po wydzieleniu do przestrzeni międzykomórkowej ulegają aktywacji proteolitycznej przez inne proteazy. Komórki wydzielają również substancje hamujące już aktywne MMP, są to tkankowe inhibitory proteaz (tissue inhibitors of metaloproteinases TIMP-1, -2, -3, -4). Dzięki takim mechanizmom utrzymywana jest delikatna równowaga między syntezą a degradacją ECM. Aktywacja HSC jest fizjologiczną częścią procesu „gojenia” uszkodzeń wątroby, lecz przedłużająca się aktywność HSC prowadzi do włóknienia wątroby [3].

Zmiany zachodzące we włókniejącej wątrobie pogarszają jej funkcję powodując zmniejszenie wytwarzania czynników krzepnięcia, albuminy surowicy krwi oraz zmniejszając aktywność detoksyfikacyjną wątroby [49]. Dalszy rozwój choroby prowadzi do marskości wątroby i głębokiej niewydolności tego narządu. W marskiej wątrobie często dochodzi do procesu nowotworzenia i rozwoju pierwotnego raka wątroby. Jest to jeden z najczęstszych złośliwych nowotworów na świecie (około 1 milion zachorowań w roku) [8].

Włóknienie wątroby może być częściowo odwracalne pod warunkiem eliminacji pierwotnego czynnika uszkodzającego wątrobę. Na możliwości wyleczenia mają istotny wpływ takie czynniki jak: istniejący stopień zahamowania aktywności enzymów degradujących ECM (MMP), wytwarzanie substancji hamujących aktywność tych enzymów (TIMP), czas trwania choroby (im dłuższy czas, tym większe usieciowanie kolagenu i trudniejsze jego usunięcie), ogólna ilość nieprawidłowej ECM w narządzie [49]. Leczenie włóknienia wątroby jest trudne, terapia nie jest

wystarczająco skuteczna i wielu pacjentów na nią nie reaguje. Potrzebne są więc dalsze badania dotyczące mechanizmów włóknienia i leków skutecznych w hamowaniu tego procesu.

## 2. CZYNNIKI PROMUJĄCE AKTYWACJĘ KOMÓREK GWIAZDZISTYCH

Uszkodzenie wątroby powoduje przejście spoczynkowych HSC w postać aktywowaną. Objawia się to zmianą fenotypu: z komórek neuronopodobnych mających liczne wypustki, HSC przekształcają się w postać wrzecionowatą przypominającą fibroblasty. Przebudowie ulega cytoskeleton komórki, pojawia się  $\alpha$ SMA, dzięki czemu HSC uzyskują zdolność ruchu i chemotaksji oraz zaczynają szybciej proliferować. W wyniku aktywacji HSC wytwarzają nadmierne ilości ECM o zwiększonej ilości kolagenu typu I, co jest bezpośrednią przyczyną włóknienia tkanek wątroby [60].

Aktywacja HSC następuje pod wpływem czynnika uszkodzającego wątrobę, ale w procesie tym pośredniczy wiele substancji wytwarzanych w procesie uszkodzenia. Najsilniejsze działanie wykazują cytokiny, w tym: interleukiny, czynniki wzrostu i chemokiny, takie jak: PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, ET-1, FGF, PAF, MCP-1, IGF, IL-6, KGF, leptyna, HGF. Z tej grupy najsilniejsze działanie wywierają dwie substancje: PDGF oraz TGF- $\beta$  [60,116].

HSC mogą być aktywowane przez reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species – ROS) powstające w wyniku metabolizmu etanolu czy innych toksyn, lub wytwarzane przez komórki układu odpornościowego. ROS są cząsteczkami wysoce aktywnymi, atakują makromolekuły komórkowe zmieniając ich właściwości i aktywność. Produkty tych reakcji są następną grupą aktywatorów włóknienia [133,135].

Aktywację HSC umownie można podzielić na dwa etapy: inicjację i kontynuację. Za inicjowanie procesu aktywacji HSC odpowiadają przede wszystkim czynniki parakryne – pochodzące z innych źródeł niż własna komórka. Natomiast kontynuacja aktywacji, choć wspomagana także przez stymulację parakrynną, zależy przede wszystkim od czynników autokrynych [116].

### 2.1. Rola LPS w aktywacji HSC

W ALD (alcoholic liver disease) komórkami inicjującymi proces aktywacji HSC są osiadłe makrofagi zwane komórkami Browicza-Kupffera (KBK). Nadmierne i przewlekłe spożywanie alkoholu powoduje namnożenie się flory bakteryjnej Gram-ujemnej w przewodzie pokarmowym [134]. Głównym składnikiem ściany komórkowej u tego typu bakterii jest lipopolisacharyd (LPS) zwany również endotoksyną, który jest bardzo silnym stymulatorem komórek układu odpornościowego. Spożyty alkohol etylowy oddziałuje bezpośrednio na błonę śluzową jelita zwiększając jego przepuszczalność dla makromolekuł, takich jak LPS [11]. Dzieje się tak na skutek zwiększenia płynności lipidów i lipoprotein w błonach śluzówki [134]. Endotoksyna przedostaje się z jelit poprzez krążenie wrotne do wątroby, gdzie wykrywana jest przez TLR4 znajdujący się w błonie KBK. Domeny cytoplazmatyczne TLR4 rozpoczynają kaskadę fosforylacji obejmującą aktywację JNK, p38 oraz NF- $\kappa$ B prowadzącą do zwiększenia ekspresji genów cytokin i chemokin prozapalnych, takich jak: TGF- $\beta$ , TNF,

IL-8, IL-1 czy MCP-1 [134,139,152] oraz ROS powodując rozwój stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego [132].

Ponadto, aktywowane KBK są źródłem MMP-9, która rozkładając ECM uaktywnia zawarte w niej w postaci latentnej czynniki wzrostowe i cytokiny (TGF- $\beta$ , PDGF, EGF) [60]. Wzrost poziomu cytokin prozapalnych powoduje rekrutację neutrofilii obojętnochłonnych do wątroby i progresję stanu zapalnego. Stres oksydacyjny i alkohol uwrażliwiają hepatocyty na cytotoksyczne działanie TNF, który w tych warunkach powoduje ich apoptozę i nekrozę [64,156]. Z rozpadających się hepatocytów są uwalniane dalsze substancje podtrzymujące stan zapalny [16]. Cytokiny prozapalne inicjują i podtrzymują aktywację HSC. LPS może również bezpośrednio wpływać na aktywność HSC, gdyż komórki te wykazują ekspresję TLR4 na powierzchni błony komórkowej [86,103]. Wykazano, że nawet niskie stężenia LPS aktywują NF- $\kappa$ B, JNK oraz stymulują syntezę chemokin i molekuł adhezyjnych istotnych w rozwoju ALD [103].

## 2.2. Rola metabolizmu etanolu w aktywacji HSC

Alkohol etylowy w krótkim czasie po spożyciu jest wchłaniany poprzez błony śluzowe przewodu pokarmowego do krwiobiegu. Z krwi etanol wychwytywany jest i metabolizowany głównie w wątrobie (90%), pozostała część metabolizowana jest w nerkach i płucach. Istnieją trzy główne drogi utleniania etanolu w komórkach wątroby. W pierwszej z nich etanol utleniany jest do aldehydu octowego (acetaldehyde – AcAld) przez dehydrogenazę alkoholową (alcohol dehydrogenase – ADH). Aldehyd z kolei utleniany jest do kwasu octowego z udziałem dehydrogenazy aldehydowej (acetaldehyde dehydrogenase – ALDH). Przy obu tych reakcjach redukowany jest kofaktor dinukleotyd nikotynamidowy (nicotinamido dinucleotide – NAD). Duże nasilenie tych reakcji powoduje nagromadzenie się postaci zredukowanej NAD (NADH), co z kolei zaburza potencjał oksydoredukcyjny w hepatocytach i cały metabolizm wątroby [82]. Nieprawidłowo funkcjonujący cykl Krebsa powoduje gromadzenie się nadmiernych ilości kwasu mlekowego, gdyż brak NAD uniemożliwia utlenianie pirogronianu, który przekształcany jest w kwas mlekowy. W końcowym etapie dochodzi do zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej krwi. Nadmiar NADH promuje syntezę i odkładanie trójglicerydów, działanie to wspiera zablokowanie  $\beta$ -oksydacji poprzez upośledzenie cyklu Krebsa. Prowadzi to do odkładania tłuszczu w hepatocytach [35,50,82] i rozwoju alkoholowego stłuszczenia wątroby.

Przewlekłe nadużywanie alkoholu zwiększa aktywność mikrosomalnego systemu utleniania etanolu (MEOS). W skład MEOS wchodzi cytochrom P-450, który w obecności NADPH, tlenu oraz reduktazy NADPH i cytochromu c utlenia etanol do kwasu octowego [24]. Produktem ubocznym aktywności MEOS jest  $H_2O_2$ , który ułatwia utlenianie etanolu przez trzeci system metabolizmu etanolu – katalazę [69]. Większe stężenia etanolu, a także jego długotrwałe nadużywanie, zwiększają rolę MEOS w utlenianiu tego związku [37,83]. W konsekwencji następuje ogólny wzrost wytwarzania ROS przez hepatocyty. W wytwarzaniu ROS szczególnie aktywną jest izoforma 2E1 cytochromu P-450 (CYP2E1) [23,26,148]. Aktywność tej proteiny wzrasta przy nadużywaniu etanolu, który dodatkowo ją stabilizuje [70,72]. Uważa się, że aktywność izoformy CYP2E1

w hepatocytach i w komórkach Browicza-Kupffera jest jedną z głównych przyczyn stresu oksydacyjnego w przebiegu ALD [1,81].

Niezależnie od szlaku, metabolizm alkoholu prowadzi do powstawania aldehydu octowego, a następnie kwasu octowego. Aldehyd octowy ma większy udział w promowaniu ALD niż sam etanol. Związek ten, jak i inne aldehydy powstałe w wyniku metabolizmu etanolu: dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydrokso-2-nonenal (HNE) mogą reagować z białkami [135]. Atakowane są grupy aminowe aminokwasów, w wyniku czego powstają zasady Schiffa [136]. Kompleksy takie wykryto w wątrobie u osób nadużywających alkoholu [98,135]. Ich obecność stymuluje układ odpornościowy do wytwarzania przeciwciał, które rozpoznają również prawidłowe białka [133,135]. Następstwem tego jest rozwój stanu zapalnego i autoagresywnych reakcji układu immunologicznego w wątrobie.

## 2.3. Rola stresu oksydacyjnego w alkoholowej chorobie wątroby i procesie włóknienia

Stres oksydacyjny można zdefiniować jako nadwyżkę wytwarzanych ROS w komórce nad możliwością ich usuwania przez mechanizmy antyoksydacyjne [116].

ROS mają niesparowane elektrony na zewnętrznych powłokach swych atomów. Sprzyja to wysokiej reaktywności ROS, które wchodzą w reakcje z białkami, lipidami i DNA powodując zmianę ich aktywności lub zniszczenie. W rezultacie zaburzone zostaje prawidłowe funkcjonowanie komórki [116,140].

Ponadto ROS mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnałów w komórce [74,79,106]. Udowodniono, że nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) uczestniczą w przekazywaniu sygnału odpowiedzi na czynniki wzrostu i cytokiny [74,79]. Tak więc stres oksydacyjny może nie tylko uszkadzać komórki, ale również modyfikować ich odpowiedź na sygnały ze środowiska, czy zmieniać tempo podziałów komórkowych. Sugeruje to istotną rolę stresu oksydacyjnego w przebiegu niektórych chorób, w tym ALD [156]. Potwierdzają to próby leczenia pacjentów związkami o charakterze antyoksydacyjnym, takimi jak: S-adenozyno-metionina (SAM),  $\alpha$ -tokoferol, kwercetyna oraz resweratrol [57,81,104,107,129].

Metabolizm alkoholu etylowego w hepatocytach jest źródłem ROS. W procesie tym największą rolę odgrywa szlak MEOS. Jako pierwszy wytwarzany przez MEOS jest  $H_2O_2$ . Z udziałem jonów Fe lub Cu w reakcji Fentona z  $H_2O_2$  powstają rodniki hydroksylowe ( $OH^*$ ), które reagują z etanolem tworząc rodniki 1-hydroksyetylowe, 2-hydroksyetylowe i etoksylowe [1,69]. Rodniki hydroksyetylowe w reakcji z tlenem cząsteczkowym tworzą aldehyd octowy i anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) [75].

ROS mogą być również wytwarzane z udziałem oksydazy ksantynowej [148]. Enzym ten w fizjologicznych warunkach utlenia ksantynę lub hipoksantynę redukując NAD do NADH. Jednak w obecności etanolu oksydaza ksantynowa zaczyna wytwarzać ROS pogłębiając stres oksydacyjny [72]. Znaczącym źródłem ROS jest również łańcuch oddechowcy w mitochondriach. Przewlekłe spożywanie etanolu

powoduje, że nadmiernie wytwarzane ROS są uwalniane z mitochondriów do cytoplazmy [69]. Taki przedłużający się stan zapalny wątroby sprzyja generacji ROS. W tym przypadku źródłem ROS są osiadłe makrofagi wątrobowe KBK oraz neutrofile. Komórki te wytwarzają ROS w odpowiedzi na zagrożenie ze strony drobnoustrojów, jednak w przypadku ALD następuje nieprawidłowa ich aktywacja w odpowiedzi na docierający z jelit LPS i alkohol etylowy [132]. LPS w surowicy wiąże się do białka – LPS binding protein (LPB), z kolei kompleks LPB-LPS wychwytywany jest przez receptor LPS na powierzchni błony KBK. W skład receptora wchodzi dwa powierzchniowe białka: CD14 i MD2 oraz transbłonowy receptor TLR4 [112]. Kompleks receptorowy aktywowany przez LPS uaktywnia kinazy podstawowe dla rozwoju stanu zapalnego (JNK i p38) oraz aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B [105,112].

C-końcowa część TLR4 oddziałuje z jedną z podjednostek (Nox4) oksydazy NADPH – enzymu najważniejszego do wytwarzania ROS w leukocytach. Aktywowana oksydaza NADPH przenosi elektrony na tlen cząsteczkowy ( $O_2$ ) tworząc anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^-$ ). Jest on cząsteczką wysoce reaktywną, więc przekształca się w inne rodzaje ROS: anionorodnik nadadtlenkowy ( $O_2^-$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^*$ ) oraz tlen singletowy ( $^1O_2$ ). Najaktywniejsze spośród tych rodzajów ROS są  $OH^*$  i  $^1O_2$  [40,107].

Różne rodzaje ROS wykazują odmienną aktywność i trwałość. Zazwyczaj im większa aktywność związku tym mniejsza trwałość. Najaktywniejszy  $OH^*$  ma czas półtrwania  $10^{-9}$  s, co oznacza, że może dyfundować na odległość zaledwie 2 nm zanim ulegnie dezaktywacji. Nadtlenek wodoru jest dość stabilny aby przekroczyć błonę cytoplazmatyczną,  $O_2^-$  również jest do tego zdolny, ale w dużo mniejszym stopniu [107]. Oznacza to, że ROS oddziałują miejscowo wpływając na szlaki sygnałowe komórki [74,79] lub utleniają makrocząsteczki komórkowe. Produkty peroksydacji lipidów, takie jak 4-hydrokso-2,3-nonenal (HNE) czy 4-hydrokso-2,3-alkenal (HAK), mają długi okres półtrwania, a ich lipofilność zapewnia łatwość dyfuzji przez błony biologiczne. Dzięki temu związki te mogą również wpływać na szlaki sygnałów innych komórek niż te, w których były wytworzone [74,79,106].

Sytuacja taka występuje w ALD, gdy w aktywowanych HSC, HNE zwiększają aktywność JNK i AP-1, co prowadzi do wzrostu syntezy kolagenu I [29,108]. Ponadto  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  stymulują aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2), która może wzmacniać aktywację HSC poprzez metabolity kwasu arachidonowego [99], a także przez wytwarzanie ROS [10,72]. Nadtlenek wodoru pośredniczy także w szlaku sygnałów biegnących z receptorów aktywowanych przez TGF- $\beta$ , promując aktywność C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein) i syntezę kolagenu I [38,59,107]. ROS i HNE w HSC zwiększają także syntezę MCP-1, chemokiny odpowiedzialnej za przyciąganie aktywowanych leukocytów z zatok wątrobowych do tkanki parenchymalnej [89,107], co w konsekwencji zwiększa stan zapalny, wytwarzanie ROS oraz cytokin prozapalnych i prowłóknieniowych.

Stres oksydacyjny jest głównym elementem w rozwoju ALD. Procesy stanowiące jego istotę są silnie powiązane

z wytwarzaniem cząstek sygnałowych (cytokin, chemokin i interleukin). Jest to samonapędzający się mechanizm, którego następstwem jest rozwój procesów włóknienia wątroby.

W warunkach fizjologicznych generowane ROS usuwane są przez komórkowe systemy antyoksydacyjne: enzymatyczne i nieenzymatyczne. Do zabezpieczeń enzymatycznych zalicza się: katalazę, peroksydazę glutationową, dysmutazę nadadtlenkową oraz metalotioneiny, ferrytynę i ceruloplazminę. Nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne stanowią: glutation, witaminy A, C, E, bilirubina, ubichinon (koenzym Q10), kwas moczowy. Dysmutaza nadadtlenkowa występuje w dwóch odmianach: pierwsza ma w centrum katalitycznym atomy cynku i miedzi (CuZnSOD) i występuje przede wszystkim w cytoplazmie, druga SOD ma atomy manganu w centrum katalitycznym (MnSOD) i obecna jest w matrix mitochondrialnym [112]. Obie SOD katalizują reakcję dysmutacji  $O_2^-$  do  $H_2O_2$  i tlenu cząsteczkowego. Nadtlenek wodoru z kolei rozkłada się przez katalazę i selenozależną peroksydazę glutationową (GPX) [46,47].

Peroksydaza glutationowa może redukować również organiczne nadttlenki, np. produkty peroksydacji lipidów. Przy wysokim stężeniu etanolu dodatkowo katalaza uczestniczy w jego metabolizmie utleniając etanol do aldehydu octowego [112].

Ferrytyna, ceruloplazmina i metalotioneiny są grupą białek wiążącą i przechowującą metale. Szczególnie ważne w ALD są jony żelaza i miedzi, ponieważ mogą one nasilić stres oksydacyjny katalizując reakcje powstawania ROS. Istotność roli żelaza i miedzi w rozwoju włóknienia wątroby potwierdzają przypadki chorób związanych z defektem genetycznym (hematochromatoza i choroba Wilsona), polegających na gromadzeniu przez wątrobę nadmiaru tych metali. Prowadzi to nieuchronnie do włóknienia i marskości wątroby [107,110,113].

Glutation (GSH) jest trójpeptydem (Glu-Cys-Gly) zawierającym wolną grupę tiolową (SH), dzięki której wykazuje właściwości redukcyjne. Występuje w cytosolu i mitochondriach wątroby w stężeniu 5–10 mM. Jego aktywność odgrywa dużą rolę w usuwaniu wolnych rodników [84].

Mimo bogatego arsenału antyoksydacyjnego, jaki ma wątroba, przewlekłe nadużywanie alkoholu etylowego prowadzi do wyczerpania możliwości obrony przed ROS. Dzieje się tak nie tylko z powodu nadmiernego wytwarzania ROS, ale również w wyniku upośledzenia mechanizmów antyoksydacyjnych przez etanol lub jego metabolity.

U szczurów karmionych etanolem wykryto obniżenie zarówno poziomu i aktywności katalazy, GPX oraz CuZnSOD. Mechanizm tego procesu nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo natomiast, że HNE zmniejsza aktywność GPX, prawdopodobnie przez blokowanie aktywnego centrum enzymu [112].

Przewlekłe spożywanie alkoholu etylowego powoduje niedożywienie organizmu oraz spadek poziomu witamin i mikroelementów. Dzieje się tak na skutek zaburzenia trawienia i wchłaniania z przewodu pokarmowego pod wpływem etanolu. Inną przyczyną takiej sytuacji jest szkodliwe od-

działanie alkoholu na metabolizm komórek, a zwłaszcza pracę mitochondriów. Czynniki te powodują spadek stężenia witamin i mikroelementów, spośród których wiele ma charakter antyoksydantów: witaminy C, A i E czy cynk i selen. Alkohol inaktywuje także enzym (adenozynotransferazy metioniny – MAT) uczestniczący w przemianie metioniny do S-adenozylometioniny. Niedobór tego związku powoduje zahamowanie syntezy glutationu (GSH), co zwiększa wrażliwość organizmu na stres oksydacyjny [128].

### 3. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PROLIFERACJĘ HSC

Aktywowane KBK, hepatocyty, SEC (sinusoidal endothelial cells), jak i same HSC są źródłem substancji sygnałowych odgrywających główną rolę w rozwoju włóknienia wątroby. HSC reagują na tę „burzę” sygnałową zmianami w morfologii i funkcji łącznie określanymi jako aktywacja HSC. Niezwykle istotnym elementem aktywacji jest proliferacja komórek gwiaździstych. Opisano wiele czynników stymulujących ten proces. Najważniejsze z nich opisano niżej.

#### 3.1. Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF)

Cytokiną najsilniej wzmagającą proliferację i chemotaksję HSC jest PDGF. Odgrywa on także bardzo istotną rolę w podtrzymywaniu aktywacji HSC. Potwierdzeniem tego jest to, że w marskiej wątrobie ekspresja genów PDGF i jego receptorów ulega znacznemu zwiększeniu. PDGF występuje w trzech odmianach AA, BB, AB. Najsilniej na HSC oddziałuje izoforma BB oraz AB. Jest to związane z liczbą receptorów dla tych izoform na powierzchni błony komórek HSC. W przypadku nieaktywowanych HSC występują przede wszystkim receptory izoformy AA, ale w wyniku aktywacji zwiększana zostaje liczba receptorów izoformy BB [116].

#### 3.2. Czynniki martwicy nowotworów (TNF)

TNF jest znaną cytokiną prozapalną, wytwarzaną przez aktywowane monocyty i makrofagi podczas procesów zapalnych. Jego wydzielanie najsilniej stymuluje LPS, zwłaszcza w obecności IFN- $\gamma$ , trochę słabiej działają GM-CSF i M-CSF. Udowodniono jego zaangażowanie w regulację apoptozy i proliferacji komórek, syntezy ECM i MMP. W przypadku ALD rola TNF jest raczej negatywna, gdyż cytokina ta wydzielana przez KBK i neutrofile w obecności LPS i etanolu aktywuje HSC [116]. Komórki gwiaździste pod wpływem TNF zwiększają ekspresję  $\alpha$ SMA, receptorów TGF- $\beta$  oraz syntetyzują więcej fibronektyny. Interesującym jest natomiast to, że TNF obniża syntezę kolagenu typu I oraz III [77,116] zwiększając jednocześnie wytwarzanie MMP [115]. W związku z tym nie można uznać TNF za typowy czynnik promujący włóknienie. Prawdopodobnie działa on głównie na etapie inicjacji procesu aktywacji komórek HSC i raczej działa na etapie degradacji pierwotnej ECM niż na etapie syntezy nowej, włóknistej ECM.

#### 3.3. Endotelina

Endotelina występuje w trzech izoformach: ET-1, ET-2 i ET-3. W wątrobie jest wytwarzana przez SEC, HSC i komór-

ki przewodów żółciowych. Podczas przebiegu procesów włóknieniowych poziom ekspresji ET-1 znacząco wzrasta. Dzieje się tak pod wpływem PDGF i TGF- $\beta$ . ET-1 może zwiększać poziom aktywacji HSC i promować w ten sposób włóknienie. Komórki HSC wykazują ekspresję dwóch rodzajów receptorów ET-1: ET-A i ET-B. W inicjacji aktywacji HSC główną rolę odgrywa typ A receptora, jednak w podtrzymaniu aktywacji rola receptora typu B jest bardziej istotna. Rola ET-1 nie jest wyjaśniona, ponieważ wykazano, że hamuje ona proliferację w pełni aktywowanych HSC [116].

#### 3.4. Inne czynniki promujące proliferację i aktywację HSC

TGF- $\alpha$  (tumor growth factor  $\alpha$ ) jest polipeptydem syntetyzowanym głównie przez KBK oraz aktywowane HSC [116]. W postaci aktywnej wiąże się do receptorów EGF (endothelial growth factor), stymulując proliferację i aktywację HSC. Wykazano również, że korzystny wpływ na aktywację HSC mają czynniki wzrostu: IGF [116], FGF [97], VEGF [2], CTGF [97] oraz trombina [90] i prostatynglandyny [116].

Leptyna – hormon zaangażowany w gospodarkę lipidową, występuje w zwiększonej ilości u pacjentów z ALD lub marskością wątroby [114]. Zwiększa wydzielanie cytokin prozapalnych, w tym IL-6, IL-12, TNF, przez aktywowane makrofagi, potęgując procesy zapalne [71]. Hormon ten może również aktywować bezpośrednio HSC [114] i jest zaangażowany w syntezę TIMP-1 [18].

### 4. CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE KONTROLUJĄCE PROCES AKTYWACJI HSC I FIBROGENEZY

Doświadczalnie potwierdzono, że aktywacja HSC pociąga za sobą zwiększoną aktywność NF- $\kappa$ B [47,62,63,116]. Aktywowane HSC wykazują stałą, podwyższoną w porównaniu z komórkami spoczynkowymi, poziom aktywnego NF- $\kappa$ B [43]. Mechanizm odpowiadający za to zjawisko nie jest dokładnie znany, ale wiadomo, że w komórkach aktywowanych poziom I $\kappa$ B $\alpha$  jest bardzo niski [43], a ponadto wytwarzana jest hiperfosforylowana postać I $\kappa$ B $\beta$  niemająca możliwości blokowania aktywności NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\beta$  konkurencyjnie wypiera I $\kappa$ B $\alpha$  z kompleksu NF- $\kappa$ B utrzymując go w stałej aktywności [43,73]. Przypuszcza się, że właśnie stała, podwyższona aktywność NF- $\kappa$ B jest jedną z przyczyn oporności aktywowanych HSC na apoptozę indukowaną przez TNF [80].

### 5. TRANSMISJA SYGNAŁÓW KOMÓRKOWYCH PODCZAS AKTYWACJI HSC NA PRZYKŁADZIE PDGF

Zarówno aktywowane jak i wyciszone HSC wykazują ekspresję receptorów PDGF [116]. PDGF-R po przyłączeniu liganda ulegają dimeryzacji i autofosforylacji. Miejscem fosforylacji są reszty tyrozyny w cytoplazmatycznych domenach receptora. Miejsca te działają jak kinazy tyrozynowe fosforylując białka wyposażone w domeny SH-2 i PTB, które rozprzestrzeniają sygnał dalej. Kaskada fosforylacji obejmuje kolejno białka Grb2, mSos, a następnie Ras oraz Raf-1. Raf-1 przekazuje sygnał na kinazę MEK, a ta na kinazę ERK 1/2 [111]. Aktywna postać ERK 1/2 jest transportowana do jądra, gdzie fosforyluje

Tabela 1. Czynniki transkrypcyjne kontrolujące proces aktywacji HSC i fibrogenyzy

Czynniki transkrypcyjne	Funkcja
AP-1 (activator protein 1)	Wiąże się do sekwencji DNA znajdującej się między 292 a 670 bp w pierwszym intronie ludzkiego genu COL1A1 i reguluje jego transkrypcję [55]. Bierze udział w kontroli procesów wzrostu, podziału i różnicowania komórki [122,145]. Jego aktywność wykryto jedynie w komórkach aktywowanych [4]. JunD, składnik AP-1 bierze udział w indukcji ekspresji TIMP-1 i IL-6 [125].
Sp-1 (stable protein 1)	Należy do rodziny białek zawierających „palce cynkowe”. Wiąże się z sekwencjami DNA, bogatymi w pary zasad CG w genach docelowych i zmienia ich ekspresję. W przypadku genu COL1A2 wiąże się do sekwencji w promotorze tego genu między -303 a -271 parą zasad [55]. Potwierdzeniem roli Sp-1 w wytwarzaniu kolagenu przez aktywowane HSC jest to, że w tych komórkach białko Sp-1 jest dwa razy aktywniejsze niż w komórkach wyciszonych [126].
CBP/p300 (CREB binding protein and binding protein p300)	Białka powszechnie występujące w zwierzęcych komórkach różnego typu. Oddziałują z kilkoma czynnikami transkrypcyjnymi i promotorami genów regulując ich aktywność [28,143]. Pobudzają promotor genu COL1A2 oraz mogą oddziaływać z białkami Smad [56].
C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)	Czynnik uczestniczący w zwiększaniu ekspresji kolagenu typu I przez aldehyd octowy. Pod wpływem aldehydu octowego w HSC powstaje $H_2O_2$ , który indukuje aktywność izoformy p35 C/EBP $\beta$ , a ta z kolei stymuluje aktywność transkrypcyjną promotora genu kolagenu I [54,61]. TNF stymuluje natomiast aktywność lżejszych izoform p20 C/EBP $\beta$ i $\delta$ , które niemając domeny aktywacyjnej, działają jak represory transkrypcyjne [54,83].
Smad	Czynniki fosforylowane przez aktywne receptory TGF- $\beta$ , a następnie przekazujące sygnał aktywacyjny do jądra. Składają się z dwóch domen i bogatego w prolinę łącnika. Domena MH-1 (N-końcowa) odpowiada za bezpośrednie interakcje z DNA w jądrze. C-końcowa domena MH-2 zawiera sekwencję SSXS, w której znajduje się seryna fosforylowana przez cytoplazmatyczną domenę receptora TGF- $\beta$ R I [67]. Z komórek ssaków wyizolowano 8 rodzajów Smad, które podzielono na trzy grupy: R-Smad (Smad 2 i 3) mające domeny MH-1 i 2 oraz sekwencję SSXS. Odpowiedzialne są za bezpośrednie interakcje z TGF- $\beta$ R I i DNA. Co-Smad (Smad 4), które nie mają sekwencji SSXS, mają natomiast sekwencję I, niespotykaną w R-Smad. Smad 4 asocjuje z fosforylowanymi R-Smad, co pozwala na transport dimeru przez otoczkę jądrową. I-Smad (Smad 6 i 7) nie mają sekwencji SSXS oraz domeny MH-1, przez co konkurencyjnie hamują fosforylację R-Smad [60,67].
BTEB (basic transcriptional element binding)	Czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek zawierających „palce cynkowe”. Wiąże się on do sekwencji DNA bogatych w pary GC obecnych w promotorach genów. Po związaniu, BTEB reguluje aktywności docelowych genów [55]. Doświadczalnie potwierdzono udział tego czynnika w pozytywnej regulacji genu kolagenu typu I w HSC. BTEB pod wpływem aktywowanej JNK wchodził w interakcje z promotorem genu COL1A1 i zwiększał jego ekspresję [30].
PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ )	Receptor jądrowy występujący obficie w spoczynkowych HSC, w których kontroluje transkrypcję genów i różnicowanie komórki [34,147]. Podczas aktywacji HSC jego ekspresja w komórce znacznie maleje, natomiast podawanie ligandów i agonistów PPAR $\gamma$ do hodowli aktywowanych HSC odwraca proces aktywacji. Pod ich wpływem obniża się tempo proliferacji, chemotaksja, ekspresja MCP-1, $\alpha$ SMA i kolagenu I w HSC [53,90,94].
NF $\kappa$ B (nuclear factor $\kappa$ B)	Występuje w postaci dimeru dwóch białek z rodziny Rel (p65, p50, c-Rel lub RelB). Jego aktywatorami są cytokiny lub promieniowanie UV [57,86]. NF- $\kappa$ B występuje w cytoplazmie w postaci nieaktywnego kompleksu ze swoim naturalnym inhibitorem I $\kappa$ B $\alpha$ . Pojawienie się odpowiedniego aktywatora w środowisku rozpoczyna kaskadę fosforylacji prowadzącą do ufosforylowania I $\kappa$ B $\alpha$ przez I $\kappa$ K (inhibitor of $\kappa$ B kinase), a następnie jego ubiquitynacji i degradacji [74] (ryc. 1). Uwolniony i aktywny NF- $\kappa$ B transportowany jest poprzez otoczkę jądrową do jądra komórkowego, gdzie stymuluje aktywność genów mających odpowiednie sekwencje rozpoznawane przez NF- $\kappa$ B. Jednym z tych genów jest gen kodujący I $\kappa$ B $\alpha$ , co stanowi pewnego rodzaju mechanizm bezpieczeństwa, który w ciągu godziny od stymulacji uzupełnia zużyte zasoby I $\kappa$ B $\alpha$ [57,74,86].

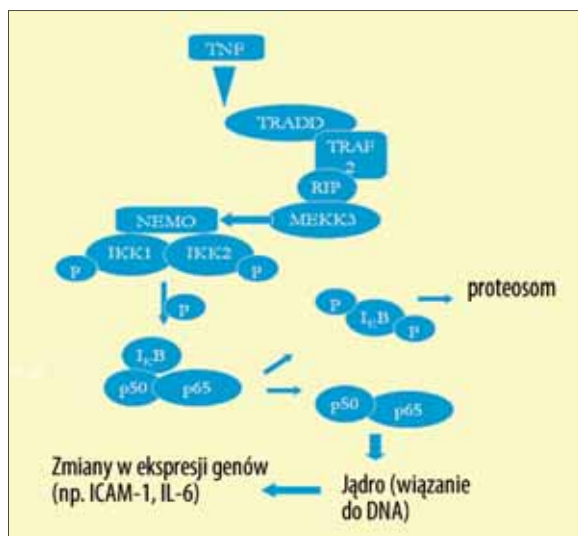
wiele czynników transkrypcyjnych, m.in. Elk-1 i SAP. Pod wpływem Elk-1 zwiększona zostaje ekspresja protoonkogenu *c-fos*, który może zwiększać aktywność AP-1 [13]. Aktywowany PDGF-R (lub inny receptor czynnika wzrostu) może poprzez małe wiążące GTP białka Ras aktywować kinazę PAK [68], a następnie kinazy MKK, SEK, które z kolei aktywują kinazę JNK [151]. Fosforylowane JNK transportowane są do jądra, gdzie aktywują czynniki *c-jun* i ATF2. Powoduje to zwiększenie aktywności czynników transkrypcyjnych AP-1 [13], Elk-1 oraz SAP [51]. Pod wpływem PDGF w HSC zwiększa się również aktywność genów, takich jak: *erg*, *jun* i *fos*. Zmiany te pro-

wadzą do zwiększenia tempa proliferacji oraz stymulują chemotaksję HSC [13].

### 5.1. Kinaza fosfatydylo-3-inozytoli (PI3K)

Kinaza fosfatydylo-3-inozytoli (PI3K) zawiera w swej strukturze domenę SH-2 i dzięki temu fragmentowi jest aktywowana przez PDGF-R [51]. PI3K składa się z podjednostki regulatorowej o masie 85 kDa oraz katalitycznej 110 kDa. Aktywowany PDGF-R pobudza poprzez domenę SH-2 aktywność PI3K. Aktywna kinaza PI3K fosforyluje różnorodne pochodne inozytoli, które odgrywają istotną rolę w dalszej





Ryc. 1. Szlak aktywacji czynnika NF-κB prowadzący do fosforylacji IκB, jego degradacji i uwolnienia aktywnego NF-κB

propagacji sygnału [36,51,141]. Fosfoinozitolowe pochodne wiążą się z Atk (kinaza białkowa B), powodując jej przemieszczenie do błony cytoplazmatycznej. W błonie Atk jest fosforylowana przez zależną od fosfoinozytoli kinazę 1 (PDK-1) w resztach serynowych (pozycja 473) i treoninowych (pozycja 308) [14,28,36,135]. Aktywacja Atk promuje proliferację i chroni przed apoptozą HSC [34,76,78].

Wiadomo również, że PI3K aktywuje kinazę białkową C (PKC) oraz rybosomalną kinazę S6 (RSK) [111,141]. RSK aktywuje czynnik transkrypcyjny C/EBP odgrywający znaczącą rolę w aktywacji HSC, syntezy kolagenu typu I oraz przeciwdziałaniu apoptozie aktywowanych HSC. Proces hamowania apoptozy prawdopodobnie zależy od blokowania aktywacji kaspazy 8 przez aktywną postać C/EBP [14]. Ponadto udowodniono, że szlak sygnału zapoczątkowanego przez związanie liganda do PDGF-R, biegnący przez PI3K wywołuje proliferację i jest konieczny do zaistnienia chemotaksji u HSC [111].

W komórkach istnieje mechanizm autoregulujący aktywność PDGF. Aktywowane przez PDGF HSC syntetyzują więcej prostaglandyn (PGE<sub>2</sub>), które zwiększają poziom cAMP. Cykliczny AMP hamuje promitotyczną aktywność PDGF [45,85] przez aktywację cAMP-zależnej kinazy (PKA). PKA fosforyluje Raf-1 w taki sposób, że Raf-1 traci aktywność i nie aktywuje ERK [111]. Ponadto PKA fosforyluje CREB – czynnik transkrypcyjny zaangażowany w redukcję proliferacji HSC [65]. Potwierdzają to doświadczenia z użyciem inhibitorów fosfodiesterazy: pentoksyfiliny [51] oraz izometylobutyliku ksantyny [65]. Zmniejszały one skutki oddziaływania PDGF na HSC poprzez hamowanie rozkładu cAMP.

## 5.2. Udział kanałów jonowych w transmisji sygnałów generowanych z PDGF-R związanego z ligandem

Podczas oddziaływania PDGF na komórkę zaobserwowano wzrost stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie. Jak pokazują wyniki badań zjawisko to jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania szlaku sygnałów z PDGF-R. Jony wapnia

pochodzą z dwóch źródeł: z zapasów wewnętrznych komórki oraz ze środowiska zewnętrznego (poprzez kanały Ca<sup>2+</sup>). Aktywność kanałów wapniowych kontrolowana jest przez kinazę tyrozynową związaną z PDGF-R za pośrednictwem kinaz Grb2, mSos oraz Ras. Aktywność kanałów jonowych odgrywa większą rolę w transmisji sygnałów niż uwalnianie wewnątrzkomórkowych zapasów wapnia [111].

Kolejnym kanałem jonowym zaangażowanym w ekspresję aktywności PDGF jest wymiennik Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Świadczą o tym badania z użyciem amiloridyny (inhibitora Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), która hamuje aktywność PDGF [6]. Nie jest do końca wyjaśnione jak wymiennik Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> wspiera aktywność biologiczną PDGF. Wiadomo, że działanie wymiennika Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> polega na wpompowywaniu do komórek jonów sodu w zamian za jony wodorowe. Prowadzi to do alkalizacji wnętrza komórki [41,42,111]. Szlak aktywacji wymiennika Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> również nie jest wyjaśniony. Udowodniono zaangażowanie w ten proces kinazy białkowej C oraz kalmoduliny [41] i PI3K [15].

## 5.3. Kinaza adhezji miejscowej (FAK)

W procesie aktywacji HSC niezwykle ważnym elementem jest adhezja komórki do powierzchni wzrostowej. Istnieją specjalne receptory rozpoznające rodzaj powierzchni, do której komórka przylega. Receptorami tymi są białka z rodziny integryn. Są to heterodimeryczne transbłonowe białka składające się z podjednostki α i β. Występuje 15 rodzajów podjednostek α i 8 β, razem tworzących przynajmniej 21 różnych receptorów. HSC wykazują wysoką ekspresję integryn, a zwłaszcza α1β1 i α2β1. Integryna α1β1 jest znana jako receptor kolagenu i lamininy [22]. Aktywacja integryn powoduje autofosforylację kinaz zgrupowanych w skupisku adhezyjnym, a w szczególności kinazy FAK (focal adhesion kinase) [117].

FAK jest cytoplazmatyczną proteiną o masie 125 kDa. Odgrywa główną rolę w przekazywaniu sygnałów z integryn na następne efekторы. Kontroluje ona takie funkcje komórki jak proliferacja, migracja, adhezja [117], cykl komórkowy [155] czy morfologia komórki [20]. FAK w dalszej kolejności reguluje aktywność Atk oraz PI3K [117].

W skupiskach adhezyjnych znajduje się duże zagęszczenie receptorów PDGF [20] wraz z podjednostkami FAK. Nasuwa to podejrzenia o powiązaniu tych dwóch szlaków. Istotnie, doświadczenia z HSC hodowanymi w zawieszynie tak, aby nie ulegały adhezji udowodniły również funkcjonalne powiązanie szlaków sygnałowych między PDGF-R a FAK. Przy dłuższej hodowli w zawieszynie HSC traciły zdolność do odpowiadania na stymulację przez PDGF. Dochodziło do zablokowania aktywności Ras, głównego przekaźnika sygnałów PDGF-R na szlaki aktywujące PI3K, jak również ERK i inne MAPK [19]. Wiadomo, że PDGF stymuluje fosforylację FAK, ale również – jak wynika z opisanego doświadczenia – do swojej aktywności wymaga FAK [117]. Dokładny mechanizm połączenia nie jest pewny, podejrzewa się, że szlaki te połączone są poprzez Ras-GTP/GDP [19], jak i PLCγ [21]. Aktywność FAK mogą również pobudzać czynniki wzrostu inne niż PDGF, na przykład ET-1 [111].

Innymi niż integryny receptorami występującymi na HSC i rozpoznającymi kolagen są DDR (discoidin domain re-

ceptor) [101]. Nadrodzina tych receptorów rozpoznaje kolagen jako ligand i pod jego wpływem uaktywnia kinazę tyrozynową zawartą w cytoplazmatycznej domenie receptora, która rozprzestrzenia dalej sygnał. DDR2 rozpoznaje kolagen typu I z większym powinowactwem niż pozostałe jego typy [124,143]. Udowodniono korzystny udział DDR2 w podtrzymywaniu aktywacji HSC. Pobudzenie DDR2 prowadzi do zwiększenia tempa proliferacji HSC oraz zwiększa aktywność MMP-2 [101].

#### 5.4. MAP kinazy

MAP kinazy (mitogen activated kinases – kinazy aktywne mitogenami) są rodziną białek przekazującą sygnały zmian środowiska zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego na odpowiednie efekторы. Ich aktywność powoduje odpowiedź komórki na te zmiany. Mogą być aktywne przez czynniki wzrostowe, cytokiny, stres, hormony, szok osmotyczny. Biorą udział w kontrolowaniu niezwykle istotnych procesów, takich jak: różnicowanie, embriogeneza, proliferacja oraz śmierć komórki [109].

W rodzinie MAP kinaz wyróżnia się kinazy JNK, p38, ERK1/2, ERK3, ERK5, ERK7, NLK oraz MOK [109]. W przypadku aktywacji komórek gwiazdzystych i włóknienia wątroby najistotniejsze są trzy pierwsze.

JNK (c-Jun N-terminal kinase – kinaza N-końcowego odcinka c-Jun) nazywana również SPAK (stress activated kinase – kinaza aktywowana stresem) występuje w dwóch głównych izoformach o masach 46 i 54 kDa, które są fosforylowane przez MKK4 (SEK1) i MEKK7 [109]. Aktywna postać JNK fosforyluje w c-Jun seryny w pozycjach 63 i 73, co wpływa na aktywność AP-1, w którego składzie znajduje się właśnie c-Jun. AP-1 wiąże się do swoistych sekwencji w promotorach niektórych genów zmniejszając ich aktywność, np.: stymuluje ekspresję c-Jun, co stanowi samonapędzający się mechanizm. Ponadto AP-1 wiąże się do promotora genu BTEB (basic transcriptional element binding – białko wiążące podstawowy element transkrypcyjny) i zwiększa jego ekspresję. Z kolei czynnik transkrypcyjny BTEB wiąże się do promotora genu kolagenu typu I stymulując jego aktywność [30]. W ten sposób HSC pobudzane są do wytwarzania kolagenu typu I.

Rolę ERK 1/2 opisano już wcześniej, można dodać, że kinazy te wpływają na aktywność wielu czynników transkrypcyjnych istotnych dla rozwoju włóknienia wątroby. Czynniki te są: CBP /p300, STAT3, AP-1, ATF-2 [109]. Poprzez ich stymulację ERK odgrywa ważną rolę w proliferacji, syntezie kolagenu i chemotaksji aktywowanych HSC [41,92,118,127,130]. Rola ERK1/2 w stymulacji syntezy kolagenu jest potwierdzona i dobrze udokumentowana, jednak istnieje możliwość, że aktywność tej kinazy w pewnych warunkach hamuje proliferację HSC przez zwiększenie syntezy prostaglandyn [128]. Wskazuje to na złożoność procesów transmisji sygnałów w aktywacji HSC, a także jest ostrzeżeniem, że nie można interpretować roli jednego szlaku nie uwzględniając innych.

MAPK p38 ma aż 4 izoformy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ), których aktywacja w pewnych warunkach może dawać przeciwstawne efekty [145,149]. Prawdopodobnie z tego powodu rola p38 jest kontrowersyjna w kontekście aktywacji HSC. Pewne

źródła dowodzą, że zablokowanie aktywności p38, z użyciem bezpośredniego inhibitora, powoduje zwiększenie tempa proliferacji HSC [120]. Wskazuje to na przeciwwłóknieniową aktywność p38. Jednak Shinji i wsp. z użyciem innego inhibitora p38 stwierdzili, że zahamowanie p38 spowodowało znaczne obniżenie ekspresji  $\alpha$ SMA i TIMP-1, a więc markerów charakterystycznych dla włóknienia [61]. Przyczyną rozbieżności wyników badań może być użycie różnych inhibitorów, a więc możliwości zablokowania aktywności innych izoform p38. Podobnie sprzecznych wyników jest więcej, jednak wersja o prozwłóknieniowej aktywności p38 wydaje się lepiej udokumentowana i bardziej prawdopodobna.

MAPK p38, podobnie do JNK i ERK1/2 jest fosforylowana przez MEK3 i MEK6. Ponadto aktywatory JNK, takie jak MKK4 i MEKK7, także mogą aktywować p38 [109]. Wskazuje to na połączenie wszystkich głównych szlaków MAPK i ich aktywację w podobnych warunkach środowiska. Fosforylowana p38 jest przenoszona do jądra, w którym aktywuje czynniki transkrypcyjne, m.in. ATF-2. Czynnik ten aktywuje transkrypcję czynnika Runx2 [7], który fosforylowany przez MAPK p38 [150] zwiększa ekspresję TIMP-1 promując w ten sposób procesy włóknieniowe [7,17]. Ponadto aktywna postać p38 stabilizuje mRNA dla TNF, cyklooksyzogenazy 2 i kolagenu typu I [39]. Dramatyczny jest zwłaszcza wzrost stabilności mRNA kolagenu I, gdyż u wyciszonych HSC wynosi on 1,5 godziny, podczas gdy u aktywowanych aż 24 godziny [126].

#### 6. FIBROGENEZA

Bezpośrednią przyczyną rozwoju włóknienia wątroby jest nadmierne wytwarzanie ECM przy upośledzonych mechanizmach jej usuwania. Główną grupą komórek odpowiedzialnych za utrzymywanie równowagi pomiędzy syntezą a degradacją ECM są HSC. Komórki te syntetyzują zarówno komponenty ECM, jak i enzymy je degradujące – metaloproteiny macierzy (MMP) – oraz ich inhibitory (TIMP) [5,60]. Aktywowane HSC wytwarzają zwiększone ilości ECM, co doprowadza do odkładania jej w przestrzeniach Dissego. W skład nowej ECM wchodzi głównie kolageny typu I, III oraz glikoproteiny, takie jak laminina, undulina czy fibronektyna. Mimo że wszystkie te białka wydzielane są jednocześnie, to najszybsze tempo dotyczy kolagenu I i to on z biegiem procesu włóknienia zaczyna dominować. W ECM – marskiej wątroby stanowi on przeszło 53% spośród wszystkich rodzajów kolagenu. Ostatecznie w marskiej wątrobie jest około siedem razy więcej całkowitego kolagenu niż w prawidłowej wątrobie [60].

Kolagen typu I jest białkiem starym filogenetycznie i konserwatywnym, przez co występuje w nim dużo homologicznych fragmentów wspólnych dla różnych gatunków zwierząt. Białko to ma strukturę potrójnej helisy, dwa jego łańcuchy powstają w wyniku ekspresji genu COL1A1, a jeden genu COL1A2 [54]. Bardzo interesującym jest to, że czas półtrwania mRNA tych polipeptydów w aktywowanych HSC jest prawie dwudziestokrotnie dłuższy niż w spoczynkowych HSC. Jest to możliwe dzięki interakcji specjalnego białka  $\alpha$ CP (cytoplasmic protein  $\alpha$ ) z bogatą w cytozyny sekwencją, obecną na końcu 3' mRNA prokolagenu. Kompleks taki zachowuje się stabilniej niż „naga” cząsteczka mRNA. W połączeniu z dwukrotnie większą

aktywnością translacyjną genu powoduje to 60–70-krotne zwiększenie ilości mRNA kolagenu w aktywowanych HSC w stosunku do spoczynkowych. Przekłada się to następnie na zwiększone wytwarzanie tego białka [126].

Kolagen w niewielkich ilościach jest syntetyzowany stale przez spoczynkowe HSC, jednak pod wpływem różnych czynników, a zwłaszcza niektórych cytokin indukowana jest dodatkowa jego ekspresja [126]. Najsilniejszą i najlepiej scharakteryzowaną cytokiną promującą syntezę kolagenu typu I jest TGF- $\beta$  [9,12,54]. Występuje ona w postaci homodimeru o masie 25 kDa. Wyróżnia się jej trzy izoformy  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 3$ . Syntetyzowane są i wydzielane w postaci latentnej, wiążą się z białkami ECM i pozostają tam do czasu aktywacji przez enzymy proteolityczne [54].

Aktywny TGF- $\beta$  stymuluje syntezę składników ECM: kolagenu typu I, fibronektyny, lamininy oraz hamuje wytwarzanie enzymów degradujących ECM. Cytokina ta pełni ważną rolę w procesach gojenia się ran, włóknienia, embriogenezy i nowotworzenia [9,54,119]. Aktywowany proteolitycznie TGF- $\beta$  wiąże się do dimeru receptorów TGF- $\beta$ RII. Taki kompleks łączy się z dimerem TGF- $\beta$ RI i fosforyluje jego cytoplazmatyczną domenę. Tetrametr receptorów działa jak kinaza białka SARA, które wiąże i transfosforyluje Smad 3/2 (R-Smad). Fosforylacja R-Smad pozwala na ich oddysocjowanie od SARA i dimeryzacji z Smad 4 (co-Smad). Kompleks co-Smad/pR-Smad transportowany jest do jądra, w którym stymuluje syntezę mRNA kolagenu, wiążąc się do sekwencji CAGACA między -263 a -258 parą zasad w regionie promotora genu COL1A2 [32,33,58,66,119,154].

Aktywacja TGF- $\beta$ R przez TGF- $\beta$  powoduje również indukcję syntezy I-Smad (Smad 7). I-Smad następnie hamuje fosforylację Smad 2/3 przez konkurencyjne wypieranie R-Smad z kompleksu TGF- $\beta$ R. Cykl ten stanowi ujemne sprzężenie zwrotne zapewniające wewnętrzną regulację aktywacji [66,96]. Jednak w aktywowanych HSC mechanizm ten zawodzi. Wiadomo, że fosforylowane R-Smad mogą przebywać w jądrze w sposób niezależny od aktywności TGF- $\beta$ R [67]. W takim przypadku I Smad, hamujący fosforylację R-Smad przez TGF- $\beta$ R, nie wpływa na poziom aktywacji R-Smad.

Istnieje również inne wyjaśnienie tego zjawiska. SAPK (aktywowane przez stres kinazy: JNK i p38) mogą fosforylować R-Smad, lecz nie w sekwencji SSXS tylko w bogatym w prolinę łączniku między domenami Smad. W przypadku aktywowanych HSC taka fosforylacja Smad 3 zapewnia jego akumulację w jądrze i w konsekwencji zwiększone wytwarzanie kolagenu typu I. Aktywowany w taki sposób Smad 3 stymuluje ekspresję genów kodujących ECM, ale nie aktywuje ekspresji genu dla Smad 7 [50,131]. Ponadto, SAPK mogą być aktywowane zarówno przez TGF- $\beta$  jak i inne cytokiny i czynniki wzrostowe, np. PDGF – odgrywający zasadniczą rolę w proliferacji i aktywacji HSC [44,151]. Część badaczy twierdzi, że gdy HSC są w pełni

aktywowane fosforylacja Smad 3 w sekwencji SSXS traci na znaczeniu, a główną rolę zaczyna odgrywać fosforylacja Smad 3 w łączniku, przeprowadzana głównie przez MAPK p38 [50].

W aktywowanych HSC występuje rodzaj podwójnego „ominięcia” hamującej aktywności Smad 7: z jednej strony zablokowanie jego ekspresji, a z drugiej niezależna od TGF- $\beta$  droga aktywacji poprzez SAPK. Do sytuacji takiej dochodzi tylko wtedy, gdy czynniki aktywujące HSC działają w sposób przewlekły, po aktywacji i transformacji spoczynkowych HSC [50,131].

W świetle powyższych informacji Smad 3 wydaje się głównym elementem odpowiedzialnym za transmisję sygnału sterującego nadmiernym wytwarzaniem ECM w aktywowanych HSC. Potwierdzają to wyniki doświadczalne, z których wynika, że nadekspresja Smad 3 skutkuje pojawieniem się markerów aktywacji HSC i nadmiernego wytwarzania  $\alpha$ SMA, kolagenu typu I i fibronektyny [137]. Świadczą o tym doświadczenia prowadzone na myszach niewykazujących ekspresji Smad 3, które były mniej podatne na włóknienie wątroby w porównaniu do myszy typu dzikiego [48].

Ekspresję genów kolagenu wspomagają również inne czynniki białkowe: Sp-1 współdziała z Smad 3/4 wiążąc się do promotora genów kolagenu i stymuluje jego aktywność [153]. P300/CBP uczestniczy w przekazywaniu sygnału z receptorów TGF- $\beta$ R i stymulacji syntezy ECM, jednak jest zależny od Smad. Przy braku ekspresji Smad 4, P300/CBP traci swoją stymulacyjną aktywność [55].

AP-1 ma element wiążący go do promotora genu *COL1A2* (między -265 do -241 zasadą). Jego aktywność jest podstawowa w aktywacji tego promotora w odpowiedzi na sygnały z TGF- $\beta$ R związanego z ligandem [54]. Ponadto AP-1 dzięki obecności białek Jun w swym składzie może być stymulowany przez JNK [44]. Jest to kolejne „skrzyżowanie” szlaków sygnałowych z MAPK i TGF- $\beta$ R.

Oprócz TGF- $\beta$  i innych czynników białkowych, wytwarzanie kolagenu typu I w HSC może stymulować aldehyd octowy – bezpośredni produkt utleniania alkoholu etylowego [130]. Dokładnie nie wiadomo, jaki jest mechanizm pośredniczący w tym procesie, jednak pewne doniesienia wskazują na rolę kinazy białkowej C. PKC stymulowana przez aldehyd octowy pobudza aktywność PI3K, ERK1/2 lub RSK [128]. Dzięki aktywacji tych najważniejszych dla fibrogenezy kinaz, ten toksyczny metabolit etanolu kontroluje ekspresję genów kolagenu typu I. Potwierdzają to obserwacje o podwyższaniu przez aldehyd octowy poziomu mRNA dla c-fos i c-jun – składników AP-1 w sposób zależny od PKC [113]. Aldehyd ten stymuluje także JNK, a ta z kolei AP-1, który w następstwie reguluje aktywność BTEB bezpośrednio wiążącego się z promotorem genu kolagenu typu I [30].

## PIŚMIENNICTWO

[1] Albano E., French S.W., Ingelman-Sundberg M.: Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front. Biosci.*, 1999; 4: D533–D540

[2] Ankoma-Sey V., Matli M., Chang K.B., Lalazar A., Donner D.B., Wong L., Warren R.S., Friedman S.L.: Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene*, 1998; 17: 115–121

- [3] Arthur M.J.: Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000; 279: G245–G249
- [4] Bahr M.J., Vincent K.J., Arthur M.J., Fowler A.V., Smart D.E., Wright M.C., Clark I.M., Benyon R.C., Iredale J.P., Mann D.A.: Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. *Hepatology*, 1999; 29: 839–848
- [5] Bataller R., Brenner D.A.: Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 209–218
- [6] Benedetti A., Di Sario A., Casini A., Ridolfi F., Bendia E., Pignini P., Tonini C., D'Ambrosio L., Feliciangeli G., Macarri G., Svegliati-Baroni G.: Inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Gastroenterology*, 2001; 120: 545–556
- [7] Bertrand-Philippe M., Ruddell R.G., Arthur M.J.: Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transcription by RUNX1 and RUNX2. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 24530–24539
- [8] Bilimoria M.M., Lauwers G.Y., Doherty D.A., Nagorney D.M., Belghiti J., Do K.A., Regimbeau J.M., Ellis L.M., Curley S.A., Ikai I., Yamaoka Y., Vauthey J.N.: Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch. Surg.*, 2001; 136: 528–535
- [9] Blobel G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F.: Role of transforming growth factor- $\beta$  in human diseases. *New Engl. J. Med.*, 2000; 342: 1350–1358
- [10] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V.: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond.)*, 2003; 91: 179–194
- [11] Bode C., Bode J.C.: Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol *per se* or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2005; 29: 166S–171S
- [12] Branton M.H., Kopp J.B.: TGF- $\beta$  and fibrosis. *Microbes Infect.*, 1999; 1: 1349–1365
- [13] Britton R.S., Bacon B.R.: Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1999; 23: 922–925
- [14] Buck M., Chojkier M.: A ribosomal S-6 kinase-mediated signal to C/EBP- $\beta$  is critical for the development of liver fibrosis. *PLoS One*, 2007; 2: e1372
- [15] Caligiuri A., Marrav, Failli P., DeFranco R.M., Romanelli R.G., Gentilini P., Pinzani M.: Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase PI3-K and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in hepatic stellate cells HSC: effect of canrenone. *J. Hepatol.*, 2001; 34: 84–84
- [16] Canbay A., Friedman S., Gores G.J.: Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, 2004; 39: 273–278
- [17] Cao Q., Mak K.M., Lieber C.S.: DLPC decreases TGF- $\beta$ 1-induced collagen mRNA by inhibiting p38 MAPK in hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002; 283: G1051–G1061
- [18] Cao Q., Mak K.M., Ren C., Lieber C.S.: Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant MAPK pathways. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 4292–4304
- [19] Carloni V., DeFranco R.M., Caligiuri A., Gentilini A., Sciammetta S.C., Baldi E., Lottini B., Gentilini P., Pinzani M.: Cell adhesion regulates platelet-derived growth factor-induced MAP kinase and PI-3 kinase activation in stellate cells. *Hepatology*, 2002; 36: 582–591
- [20] Carloni V., Pinzani M., Giusti S., Romanelli R.G., Parola M., Bellomo G., Failli P., Hamilton A.D., Sebt S.M., Laffi G., Gentilini P.: Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase by PDGF is dependent on Ras in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000; 31: 131–140
- [21] Carloni V., Romanelli R.G., Pinzani M., Laffi G., Gentilini P.: Focal adhesion kinase and phospholipase C $\gamma$  involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 1997; 112: 522–531
- [22] Carloni V., Romanelli R.G., Pinzani M., Laffi G., Gentilini P.: Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 1996; 110: 1127–1136
- [23] Caro A.A., Cederbaum A.I.: Oxidative stress, toxicology and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 27–42
- [24] Cartmell M.T., Schulz H.U., O'Reilly D.A., Yang B.M., Kielstein V., Dunlop S.P., Halangk W., Demaine A.G., Kingsnorth A.N.: Cytochrome P450 2E1 high activity polymorphism in alcohol abuse and end-organ disease. *World J. Gastroenterol.*, 2005; 11: 6445–6449
- [25] Cassiman D., van Pelt J., De Vos R., Van Lommel F., Desmet V., Yap S.H., Roskams T.: Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.*, 1999; 155: 1831–1839
- [26] Cederbaum A.I., Wu D., Mari M., Bai J.: Cyp2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31: 1539–1543
- [27] Chan H.M., La Thangue N.B.: p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.*, 2001; 114: 2363–2373
- [28] Chan T.O., Rittenhouse S., Tschils P.: Akt/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999; 68: 965–1014
- [29] Chen A., Davis B.H.: UV irradiation activates JNK and increases  $\alpha$ 1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 158–164
- [30] Chen A., Davis B.H.: The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced Jun N-terminal kinase-dependent  $\alpha$ 1(I) collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 2818–2826
- [31] Chen S.J., Yuan W., Lo S., Trojanowska M., Varga J.: Interaction of Smad3 with a proximal Smad-binding element of the human  $\alpha$ 2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- $\beta$ . *J. Cell. Physiol.*, 2000; 183: 381–392
- [32] Chen S.J., Yuan W., Mori Y., Levenson A., Trojanowska M., Varga J.: Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$ : involvement of Smad3. *J. Invest. Dermatol.*, 1999; 112: 49–57
- [33] Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B.: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.*, 2000; 49: 497–505
- [34] Coffey P.J., Jin J., Woodgett J.R.: Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.*, 1998; 335: 1–13
- [35] Cubero F.J., Nieto N.: Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2006; 98: 460–472
- [36] Datta S. R., Brunet A., Greenberg M.E.: Cellular survival: a play in three acts. *Genes Dev.*, 1999; 13: 2905–2927
- [37] Dawidek-Pietryka K., Dudka J.: Effect of some ADH inhibitors on microsomal alcohol oxidizing system activity *in vitro*. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.*, 2001, 52: 337–345
- [38] De Bleser P.J., Xu G., Rombouts K., Geerts A.: Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor -B signaling in activated rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 33881–33887
- [39] Dean J.L., Sarsfield S.J., Tsounakou E., Saklatvala J.: p38 mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 39470–39476
- [40] Dianzani M.U.: The role of free radicals in liver damage. *Proc. Nutr. Soc.*, 1987; 46: 43–52
- [41] Di Sario A., Bendia E., Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., Bolognini L., Feliciangeli G., Jezequel A.M., Orlandi F., Benedetti A.: Intracellular pathways mediating Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activation by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 1999; 116: 1155–1166
- [42] Di Sario A., Svegliati Baroni G., Bendia E., Ridolfi F., Saccomanno S., Ugili L., Trozzi L., Marzioni M., Jezequel A.M., Macarri G., Benedetti A.: Intracellular pH regulation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in human hepatic stellate cells: effects of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor 1 and insulin. *J. Hepatol.*, 2001; 34: 378–385
- [43] Elsharkawy A.M., Wright M.C., Hay R.T., Arthur M. J., Hughes T., Bahr M.J., Degitz K., Mann D.A.: Persistent activation of nuclear factor-kappa B in cultured rat hepatic stellate involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of I $\kappa$ B family proteins. *Hepatology*, 1999; 30: 761–769
- [44] Engel M.E., McDonnell M.A., Law B.K., Moses H.L.: Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth- $\beta$ -mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 37413–37420
- [45] Failli P., DeFranco R.M., Caligiuri A., Gentilini A., Romanelli R.G., Marra F., Batignani G., Guerra C.T., Laffi G., Gentilini P., Pinzani M.: Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 2000; 119: 479–492
- [46] Fernandez-Checa J.C.: Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann. Hepatol.*, 2003; 2: 69–75

- [47] Fernandez-Checa J.C., Colell A., Garcia-Ruiz C.: S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 2002; 27: 179–183
- [48] Flanders K.C.: Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2004; 85: 47–64
- [49] Friedman S.L.: Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.*, 2003; 38: S38–S53
- [50] Furukawa F., Matsuzaki K., Mori S., Tahashi Y., Yoshida K., Sugano Y., Yamagata H., Matsushita M., Seki T., Inagaki Y., Nishazawa M., Fujisawa J., Inoue K.: p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology*, 2003; 38: 879–889
- [51] Gabele E., Brenner D.A., Rippe R.A.: Liver fibrosis: signals leading to the amplification of fibrogenic hepatic stellate cell. *Front. Biosci.*, 2003; 8: d69–d77
- [52] Galli A., Crabb D., Price D., Ceni E., Salzano R., Surrenti C., Casini A.: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000; 31: 101–108
- [53] Garcia-Trevijano E.R., Iraburu M.J., Fontana L., Dominguez-Rosales J.A., Auster A., Covarrubias-Pinedo A., Rojkind M.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces the expression of  $\alpha$ 1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP $\beta$ -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 1999; 29: 960–970
- [54] Ghosh A.K.: Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp. Biol. Med.*, 2002; 227: 301–314
- [55] Ghosh A.K., Yuan W., Mori Y., Varga J.: Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$  involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene*, 2000; 19: 3546–3555
- [56] Ghosh S., May M.J., Kopp E.B.: NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998; 16: 225–260
- [57] Godichaud S., Krisa S., Couronne B., Dubuisson L., Merillon J.M., Desmouliere A., Rosenbaum J.: Deactivation of cultured human myofibroblasts by trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol. *Hepatology*, 2000; 31: 922–931
- [58] Goto D., Nakajima H., Mori Y., Kurasawa K., Kitamura N., Iwamoto I.: Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF- $\beta$ /Smad3-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2001; 281: 1100–1105
- [59] Greenwel P., Dominguez-Rosales J.A., Mavi G., Rivas-Estilla A.M., Rojkind M.: Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha (I) collagen up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2000; 31: 109–116
- [60] Gressner A.M., Weiskirchen R.: Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets. *J. Cell. Mol. Med.*, 2006; 10: 76–99
- [61] Hattori S., Dhar D. K., Hara N., Tonomoto Y., Onoda T., Ono T., Yamanoi A., Tachibana M., Tsuchiya M., Nagasue N.: FR-167653, a selective p38 MAPK inhibitor, exerts salutary effect on liver cirrhosis through downregulation of Runx2. *Lab. Invest.*, 2007; 87: 591–601
- [62] Hellerbrand C., Jobin C., Iimuro Y., Licato L., Sartor R.B., Brenner D.A.: Inhibition of NF- $\kappa$ B in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an I $\kappa$ Bsuper-repressor. *Hepatology*, 1998; 27: 1285–95
- [63] Hellerbrand C., Jobin C., Licato L.L., Sartor R.B., Brenner D.A.: Cytokines induce NF- $\kappa$ B in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: G269–G278
- [64] Hoek J.B., Pastorino J.G.: Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage. *Semin. Liver Dis.*, 2004; 24: 257–272
- [65] Houglum K., Lee K.S., Chojkier M.: Proliferation of hepatic stellate cells is inhibited by phosphorylation of CREB on serine 133. *J. Clin. Invest.*, 1999; 99: 1322–1328
- [66] Hu P.C., Datto M.B., Wang X.F.: Molecular mechanisms of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Endocrine Rev.*, 1998; 19: 349–363
- [67] Inagaki Y., Mamura M., Kanamaru Y., Greenwel P., Nemoto T., Takehara K., ten Dijke P., Nakao A.: Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J. Cell. Physiol.*, 2001; 187: 117–123
- [68] Ip Y.T., Davis R.J.: Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1998; 10: 205–219
- [69] Jelski W., Chrostek L., Szmikowski M.: Biologiczne podstawy alkoholowego uszkodzenia wątroby. *Pol. Merk. Lek.*, 2006; 124: 376–380
- [70] Jimenez-Lopez J., Cederbaum A.I.: CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 2005; 1: 671–685
- [71] Kaplan L.M.: Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology*, 1998; 115: 997–1001
- [72] Kaplowitz N.: Drug-induced liver injury. *Clin. Infect. Dis.*, 2004; 38: 44–48
- [73] Karin M., Ben-Neriah Y.: Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 621–623
- [74] Keller J.N., Mattson, M.P.: Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction and death in the nervous system. *Rev. Neurosci.*, 1998; 9: 105–116
- [75] Kessova I.G., Cederbaum A.L.: The effect of CYP2E1-dependent oxidant stress on activity of proteasomes in HepG2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005; 315: 304–312
- [76] Kim A.H., Khursigara G., Sun X., Franke T.F., Chao M.V.: Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 893–901
- [77] Knittel T., Muller L., Saile B., Ramadori G.: Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.*, 1997; 27: 1067–1080
- [78] Kulik G., Klippel A., Weber M.J. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 1595–1606
- [79] Lander H.M.: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.*, 1997; 11: 118–124
- [80] Lang A., Schoonhoven R., Tuvia S., Brenner D.A., Rippe R.A.: Nuclear factor  $\kappa$ B in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.*, 2000; 33: 49–58
- [81] Lieber C.S.: Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J. Hepatol.*, 2000; 32: 113–128
- [82] Lieber C.S.: Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta*, 1997; 257: 59–84
- [83] Lieber C.S.: The discovery of microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug. Metab. Rev.*, 2004; 36: 511–529
- [84] Lu S.C.: Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*, 2009; 30: 42–59
- [85] Mallat A., Gallois C., Tao J., Habib A., Maclouf J., Mavri P., Preaux A.M., Lotersztajn S.: Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and crosstalk with endothelin receptors. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 27300–27305
- [86] Mandrekar P.: Signaling mechanisms in alcoholic liver injury: Role of transcription factors, kinases and heat shock proteins. *World. J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 4979–4985
- [87] Mann D.A., Smart D.E.: Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut*, 2000; 50: 891–896
- [88] March S., Graupera M., Rosa S.M., Lozano F., Pizcueta P., Bosch J., Engel P.: Identification and functional characterization of the hepatic stellate cell CD38 cell surface molecule. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 176–187
- [89] Marra F., De Franco R., Grappone C., Milani S., Parola M., Leonarduzzi G., Pastacaldi S., Wenzel U.O., Pinzani M., Dianzani M.U., Laffi G., Gentilini P.: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 precedes monocyte recruitment in a rat model of acute liver injury, and is modulated by vitamin E. *J. Invest. Med.*, 1999; 47: 66–75
- [90] Marra F., De Franco R., Grappone C., Milani S., Pinzani M., Pellegrini G., Laffi G., Gentilini P.: Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology*, 1998; 27: 462–471
- [91] Marra F., Efsen E., Romanelli R.G., Caligiuri A., Pastacaldi S., Batignani G., Bonacchi A., Caporale R., Laffi G., Pinzani M., Gentilini P.: Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 2000; 119: 466–478
- [92] Marra F., Gentilini A., Pinzani M., Choudhury G.G., Parola M., Herbst H., Dianzani M.U., Laffi G., Abboud H.E., Gentilini P.: Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet derived growth factor's action on hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 1997; 112: 1297–1306

- [93] Marra F., Romanelli R.G., Ginannini C., Failli P., Pastacaldi S., Arrighi M.C., Pinzani M., Laffi G., Montalto P., Gentilini P.: Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 1999; 29: 140–148
- [94] Mathurin P., Xiong S., Kharbanda K.K., Veal N., Miyahara T., Motomura K., Rippe R.A., Bachem M.G., Tsukamoto H.: IL-10 receptor and coreceptor expression in quiescent and activated hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002; 282: G981–G990
- [95] Miyahara T., Schrum L., Rippe R., Xiong S., Yee H.F. Jr., Motomura K., Anania F.A., Willson T.M., Tsukamoto H.: Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 35715–35722
- [96] Nakao A., Afrakhte M., Morn A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke P.: Identification of Smad7, a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Nature*, 1997; 389: 631–635
- [97] Napoli J., Prentice D., Niinami C., Bishop G.A., Desmond P., McCaughan G.W.: Sequential increases in the intra hepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor  $\beta$  in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology*, 1997; 26: 624–633
- [98] Niemela O., Parkkila S., Juvonen R.O., Viitala K., Gelboin H.V., Pasanen M.: Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J. Hepatol.*, 2000; 33: 893–901
- [99] Nieto N., Greenwel P., Friedman S.L., Zhang F., Dannenberg A.J., Cederbaum A.I.: Ethanol and arachidonic acid anraese A2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. *J. Biol. Chem.*, 2000; 26: 20136–20145
- [100] Niki T., Pekny M., Hellemans K., Bleser P.D., Berg K.V., Vaeyens F., Quartier E., Schmit F., Geerts A.: Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 1999; 29: 520–527
- [101] Olaso E., Ikeda K., Eng F.J., Xu L., Wang L.H., Lin H.C., Friedman S.L.: DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 1369–1378
- [102] Paik Y.H., Lee K.S., Lee H.J., Yang K.M., Lee S.J., Lee D.K., Han K.H., Chon C.Y., Lee S.I., Moon Y.M., Brenner D.A.: Hepatic stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab. Invest.*, 2006; 86: 676–686
- [103] Paik Y.H., Schwabe R.F., Batailler R., Russo M.P., Jobin C., Brenner D.A.: Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2003; 37: 1043–1055
- [104] Pares W., Tunon M.J., Collando P.S., Herrmann S., Marroni N., Gonzalez-Gallego J.: The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J. Hepatol.*, 2000; 33: 742–750
- [105] Park H.S., Jung H.Y., Park E.Y., Kim J., Lee W.J., Bae Y.S.: Direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced induction of reactive oxygen species and activation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.*, 2004; 173: 3589–3593
- [106] Parola M., Bellomo G., Robino G., Barrera G., Dianzani M.U.: 4-Hydroxynonyl as a biological signal: molecular bases and pathophysiological implications. *Antioxid. Redox Signal.*, 1999; 1: 255–284
- [107] Parola M., Robino G.: Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J. Hepatol.*, 2001; 35: 297–306
- [108] Parola M., Robino G., Marra F., Pinzani M., Bellomo G.: HNE interacts directly with JNK isoforms human hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.*, 1998; 102: 1942–1950
- [109] Pearson G., Robinson F., Gibson T.B., Xu B., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 2001; 22: 153–183
- [110] Pietrangelo A.: Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J. Hepatol.*, 1998; 28(Suppl.1): 8–13
- [111] Pinzani M.: PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front. Biosci.*, 2002; 7: d1720–d1726
- [112] Polavarapu R., Spitz D.R., Sim J.E., Follansbee M.H., Oberley L.W., Rahemtulla A., Nanji A.: Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*, 1998; 27: 1317–1323
- [113] Poli G., Parola M.: Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 22: 287–305
- [114] Potter J.J., Womack L., Mezey E., Anania F.A.: Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 244: 178–182
- [115] Poulos J.E., Weber J.D., Bellezzo J.M., Di Bisceglie A.M., Britton R.S., Bacon B.R., Baldassare J.J.: Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity, and transin gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol.*, 1997; 273: G804–G811
- [116] Reeves H.L., Friedman S.L.: Activation of setellate cells – a key issue in liver fibrosis. *Front. Biosci.*, 2002; 7: d808–d826
- [117] Reif S., Lang A., Lindquist J.M., Yata Y., Gabele E., Scanga A., Brenner D.A., Rippe R.A.: The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 8083–8090
- [118] Reimann T., Hempel U., Krautwald S., Axmann A., Scheibe R., Seidel D., Wenzel K.W.: Transforming growth factor-1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett.*, 1997; 403: 47–50
- [119] Roberts A.B.: TGF- $\beta$  signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect.*, 1999; 1: 1265–1273
- [120] Rouach H., Fataccioli V., Gentil M., French S.W., Morimoto M., Nordmann R.: Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*, 1997; 25: 351–355
- [121] Schnabl B., Bradham C.A., Bennett B.L., Manning A.M., Stefanovic B., Brenner D.A.: TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2001; 34: 953–963
- [122] Schwabe R.F., Schnabl B., Kweon Y.O., Brenner D.A.: CD40 activates NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J. Immunol.*, 2001; 166: 6812–6819
- [123] Shaulian E., Karin M.: AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001; 20: 2390–400
- [124] Shen H., Zhang M., Kaita K., Minuk G.Y., Rempel J., Gong Y.: Expression of Fc fragment receptors of immunoglobulin G (Fc $\gamma$ Rs) in rat hepatic stellate cells. *Dig. Dis. Sci.*, 2005; 50: 181–187
- [125] Shrivastava A., Radziejewski C., Campbell E., Kovac L., McGlynn M., Ryan T., Davis S., Goldfarb M., Glass D., Lemke G., Yancopoulos G.D.: An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell*, 1997; 1: 25–34
- [126] Smart D.E., Vincent K.J., Arthur M.J., Eickelberg O., Castellazzi M., Mann J., Mann D.A.: JunD regulates transcription of the tissues inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24414–24421
- [127] Stefanovic B., Hellerbrand C., Holcik M., Briendl M., Aliehbaber S., Brenner D.A.: ostrom transcriptional regulation of collagen  $\alpha$ 1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 5201–5209
- [128] Svegliati-Baroni G., Di Sario A., Casini A., Ferretti G., D'Ambrosio L., Ridolfi F., Bolognini L., Salzano R., Orlandi F., Benedetti A.: The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate. *J. Hepatol.*, 1999; 30: 868–875
- [129] Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., Di Sario A., Casini A., Marucci L., Gaggiotti G., Orlandoni P., Macarri G., Perego L., Benedetti A., Folli F.: Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology*, 1999; 29: 1743–1751
- [130] Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., Di Sario A., Saccomanno S., Bendia E., Benedetti A., Graevenwel P.: Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2001; 33: 1130–1140
- [131] Tahashi Y., Matsuzaki K., Date M., Yoshida K., Furukawa F., Sugano Y., Matsushita M., Himeno Y., Inagaki Y., Inoue K.: Differential regulation of TGF- $\beta$  signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology*, 2002; 35: 49–61
- [132] Thakur V., Pritchard M.T., McMullen M.R., Wang Q., Nagy L.E.: Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production. *J. Leuk. Biol.*, 2006; 79: 1348–1356
- [133] Thiele G.M., Tuma D.J., Willis M.S., Miller J.A., McDonald T.L., Sorrell M.F., Klassen L.W.: Soluble proteins modified with acetaldehyde and malondialdehyde are immunogenic in the absence of adjuvant. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1998; 22: 1731–1739
- [134] Thurman R.G.: Mechanisms of hepatic toxicity. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 1998; 275: 605–611

- [135] Tocker A.: Protein kinase as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol. Pharmacol.*, 2000; 57: 652–658
- [136] Tuma D.J.: Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 32: 303–308
- [137] Uemura M., Swenson E.S., Gaça M.D., Giordano F.J., Reiss M., Wells R.G.: Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and  $\alpha$ -smooth muscle actin organization. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 4214–4224
- [138] Ueno T., Sata M., Sakata R., Torimura T., Sakamoto M., Sugawara H., Tanikawa K.: Hepatic stellate cells and intralobular in nervation in human liver cirrhosis. *Hum. Pathol.*, 1997, 28: 953–959
- [139] Uesugi T., Froh M., Arteel G.E., Bradford B.U., Thurman R.G.: Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol induced liver injury in mice. *Hepatology*, 2001; 34: 101–108
- [140] Urtasun R., Nieto N.: Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2007; 99: 223–230
- [141] Vanhaesebroeck B., Alessi D.A.: The PI3K connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.*, 2000; 346: 561–576
- [142] Vo N., Goodman R.H.: CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 13505–13508
- [143] Vogel W., Gish G.D., Alves F., Pawson T.: The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell*, 1997; 1: 13–23
- [144] Vogt P.K.: Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, 2001; 20: 2365–2377
- [145] Wang Y., Huang S., Sah V.P., Ross J. Jr., Brown J.H., Han J., Chien K.R.: Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 2161–2168
- [146] Wilson T.M., Lambert M.H., Kliewer S.A.: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001; 70: 341–367
- [147] Winau F., Hegasy G., Weiskirchen R., Weber S., Cassan C., Sieling P.A., Modlin R.L., Liblau R.S., Gressner A.M., Kaufmann S.H.: Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*, 2007; 26: 117–129
- [148] Wu D., Cederbaum A.T.: Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Res. Health*, 2003; 27: 277–284
- [149] Wu Z., Woodring P.J., Bhakta K.S., Tamura K., Wen F., Feramisco J.R., Karin M., Wang J.Y., Puri P.L.: p38 and extracellular signal regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 3951–3964
- [150] Xiao G., Jiang D., Thomas P.: MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4453–4459
- [151] Yoshida K., Matsuzaki K., Mori S., Tahashi Y., Yamagata H., Furukawa F., Seki T., Nishizawa M., Fujisawa J., Okazaki K.: Transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am. J. Pathol.*, 2005; 166: 1029–1039
- [152] Zhang F.X., Kirschning C.J., Mancinelli R., Xu X.P., Jin Y., Faure E., Mantovani A., Rothe M., Muzio M., Arditì M.: Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- $\kappa$ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7611–7614
- [153] Zhang W., Qu J., Inagaki Y., Greenwel P., Ramirez F.: Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/smud4 mediates transforming growth factor- $\beta$ 1 stimulation of  $\alpha$ 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 39237–39245
- [154] Zhang Y., Derynck R.: Regulation of Smad signaling by protein associations and signaling crosstalk. *Trends Cell. Biol.*, 1999; 9: 274–279
- [155] Zhao J.H., Reiske H., Guan J.L.: Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J. Cell. Biol.*, 1998; 143: 1997–2008
- [156] Zima T., Kalousova M.: Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2005; 29: 110S–115S

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.