

Hepatic oval cells in the liver regeneration and hepatocarcinogenesis

Wójcik M., Bobowiec R., Department of Pathophysiology, Chair of Preclinical of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The aim of this paper was to evaluate hepatic oval cells roles in liver regeneration and possible tumorigenesis. Hepatic oval cells (OCs) activation, proliferation and differentiation mainly occur when the proliferation of mature hepatocytes is inhibited by severe hepatic injury. Under such condition, oval cells activated by many cytokines, growth and neuroendocrine factors, can act as a bipotential progenitors, which can differentiate into hepatocytes and bile ductular cells. Markers commonly used to assess this differentiation include antigenic markers of hepatocyte, bile ducts and oval cells (albumin, cytokeratine-19 and OV-1 respectively). Due to the oval cells important role in liver regeneration, many authors suggest that OCs are promising source for liver repopulation in the course of cell therapy, especially in severe acute liver failure and end-stage chronic liver disease. However, apart from activation of OCs to facilitate liver regeneration, these cells may also escape proliferation control and drive liver carcinogenesis. When hepatocellular carcinoma is induced experimentally, activated OCs, augment expression of distinct markers including OV-6 and alpha-fetoprotein (Afp). Afp elevations appeared early, before pre-neoplastic nodule formation. When nodules are formed, expression of Afp is limited only to OCs located between the nodules.

Keywords: oval cells, liver regeneration, hepatocarcinogenesis.

Niewielkie uszkodzenie mięszu wątroby, np. w ostrym zakaźnym zapaleniu wątroby (*hepatitis*), w przebiegu zakażenia *Leptospira interrogans* u psów czy inwazji *Parascaris equorum* u koni, aktywuje będące w stanie „mitotycznego uśpienia” pozostałe hepatocyty, które, powielając się w jednym lub dwóch cyklach komórkowych, prowadzą do szybkiej fizjologicznej regeneracji narządu. Ich proliferacja powoduje jednak tylko odtworzenie populacji hepatocytów (1, 2). Natomiast u koni, w przebiegu np. ciężkiego zatrucia alkaloidami pirolizydynowymi, choroby Tyzera na tle przewlekłego zapalenia wątroby czy kamicy żółciowej oraz u psów na tle przewlekłego zapalenia wątroby, masowe uszkodzenie hepatocytów i zahamowana ich proliferacja aktywuje śladową grupę komórek progenitorowych, zasiedlającą kanały Heringa (3, 4, 5, 6). Kanały te utworzone częściowo przez hepatocyty, a częściowo przez cholangiocyty łączą wewnątrzplacikowy systemem kanalikowy z drzewem żółciowym (7; **ryc. 1**). Komórki strefy okołowrotnej tych kanałów, tzw. komórki owalne, nazwane

Wątrobowe komórki owalne w procesach regeneracji wątroby i hepatokarcynogenezie

Marta Wójcik, Ryszard Bobowiec

z Zakładu Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

tak ze względu na kształt jądra, pochodzą od multipotencjalnych komórek szpiku. Komórki owalne nie biorą udziału w fizjologicznej regeneracji narządu, są natomiast pobudzane po rozległej hepatektomii (2/3 masy wątroby) oraz w ciężkich ostrych i przewlekłych uszkodzeniach wątroby (2, 8).

Skład komórek wątroby ssaków

Obok tradycyjnego podziału komórek wątroby na mięszowe (hepatocyty) i niemięszowe (komórki śródbłonka, komórki Kupfera, makrofagi wątrobowe, komórki NK, komórki gwiaździste i komórki progenitorowe), niektórzy sugerują trzy przedziały proliferujących komórek, zależnie od odpowiedzi na uszkodzenie wątroby:

- 1) dojrzałe hepatocyty, dla których czynnikiem pobudzającym jest znaczny ubytek mięszu wątroby oraz zniszczenie środkowej części zrazika wątrobowego, np. czterochlorkiem węgla (CCl_4);
- 2) bipolarne komórki progenitorowe końcowych odcinków przewodów żółciowych (kanałów Heringa), regenerujące tkankę wątrobową w rozległych uszkodzeniach wątroby, w których zahamowana jest proliferacja dojrzałych hepatocytów, np. pod wpływem N-2-acetylaminofluorenu (AAF);
- 3) multipotencjalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego, przenoszone do tkanki wątrobowej w przypadkach uszkodzeń części okołowrotnej zrazików, np. alkoholem alilowym (9). Jak wspomniano, hepatocyty stosunkowo łatwo ulegają podziałom, ale tylko i wyłącznie są źródłem hepatocytów. Występujące w znacznie mniejszej liczbie komórki progenitorowe (czyli komórki owalne) mogą proliferować przez dłuższy okres niż hepatocyty, różnicując się zarówno w kierunku hepatocytów, jak i cholangiocytów. Z kolei najrzadziej spotykane w wątrobie multipotencjalne komórki macierzyste posiadają wprawdzie bardzo wysoki potencjał proliferacyjny, jednak bez rozeznania odnośnie do końcowego ich różnicowania.

Aktywność proliferacyjna hepatocytów nie jest w stanie w pełni zregenerować tkankę wątrobową, chociażby dlatego, iż daje tylko jeden rodzaj komórek

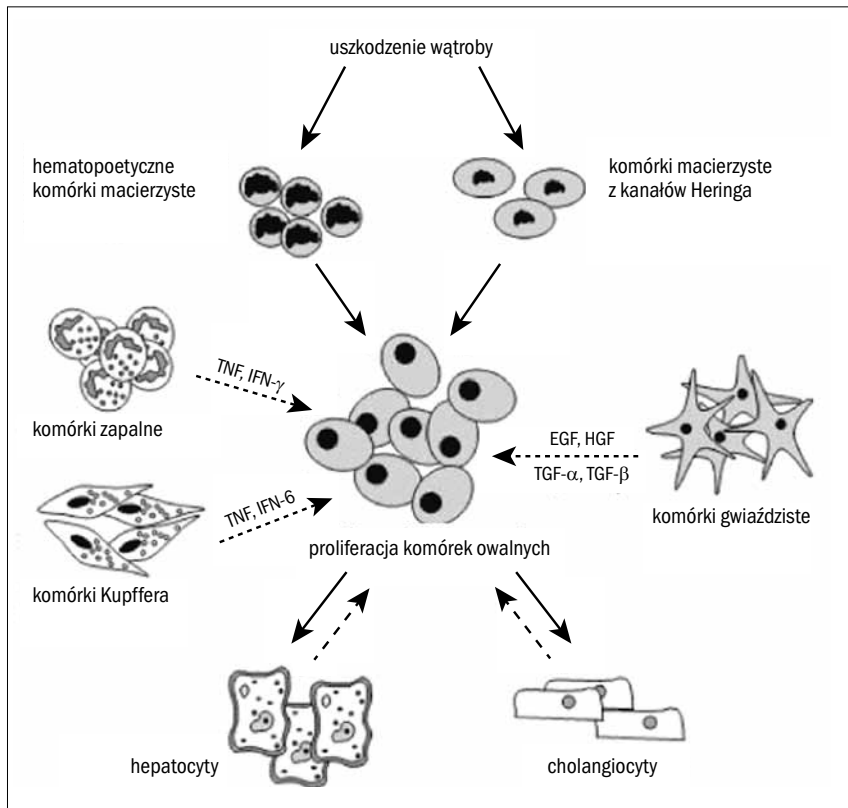
potomnych. Stąd uważa się, że za pełną regenerację narządu odpowiadają endogenne wątrobowe progenitorowe komórki owalne wraz z egzogennymi multipotencjalnymi komórkami szpiku kostnego (9).

Czynniki wzrostu regulujące aktywację i proliferację komórek owalnych

Wiele czynników wzrostowych: czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor – EGF), transformujący czynnik wzrostu α (transforming growth factor α – TGF α), czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor – HGF), rodzina czynników martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF) oraz interferon- γ pełnią kluczową rolę w proliferacyjnej odpowiedzi komórek owalnych na chirurgiczne, jak i chemiczne uszkodzenia wątroby (10, 11). O ile wytwarzany w tkankach pozawątrobowych EGF działa na drodze endokrynej, o tyle TGF α wydaje się istotnym autokrynym czynnikiem regulującym proliferację komórek owalnych. Działanie obu tych czynników sprowadza się do aktywacji kinazy tyrozynowej poprzez receptor czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor receptor – EGFR). Z kolei wytwarzany zarówno w wątrobie, jak i poza nią HGF, łączy się z odmiennym receptorem kinazy tyrozynowej (receptor c-met), nasilając proliferację komórek owalnych (10). Na podstawie doświadczeń wykonanych u myszy, żywionych karcynogenną dietą ubogą w cholinę z suplementem etioniny (CDE diet), stwierdzono, iż delecja receptora 1 dla TNF znacząco obniżyła odpowiedź proliferacyjną komórek owalnych (12). Należy brać pod uwagę fakt, iż TNF α , IL-1, IL-6, HGF, TGF oraz HNF4 α (hepatic nuclear factor-4 α) są silnymi mitogenami również dla hepatocytów, podczas gdy transformujący czynnik wzrostu – β (transforming growth factor- β – TGF- β) hamuje ich wzrost oraz indukuje apoptozę (12).

Wpływ układu nerwowego na aktywność komórek owalnych

Do czynników regulujących proliferację komórek owalnych w wątrobie zaliczany jest również autonomiczny układ nerwowy



Ryc. 2. Udział komórek owalnych w regeneracji wątroby

nad udziałem komórek owalnych w rozwoju HCC i raka przewodów żółciowych (cholangiocarcinoma – CCA) są modele hepatokarcynogenezy z użyciem:

- dietylnitrozoaminy (DEN) jako chemicznego karcynogenu o działaniu genotoksycznym, uszkadzającego hepatocyty i powodującego wzrost liczby komórek owalnych charakteryzujących się silną ekspresją AFP;
- 2-acetylaminofluorenu (2-AAF), którego podawanie poprzedzone jest wykonaniem częściowej (2/3) hepatektomii; w tym modelu komórki owalne wykazujące ekspresję płodowej izoformy kinazy pirogronianowej zasiedlają ok.30% tkanki wątrobowej i nie wykazują różnicowania się w kierunku hepatocytów;
- galaktozaminy, która powodując martwicę mięszu nasila proliferację komórek owalnych z jednoczesnym ich różnicowaniem do „przejściowych” hepatocytów i utratą markerów specyficznych dla cholangiocytów;
- tioacetamidu (TAA), związku o silnym działaniu hepatotoksycznym powszechnie stosowanego w celu indukcji marskości i nowotworzenia wątroby;
- diety ubogiej w cholinę z dodatkiem etioniny (CDE diet – choline deficient, ethionine supplemented diet), podawanie której doprowadza do apoptozy hepatocytów i silnego rozwijającego się w pierwszych dniach żywienia stanu zapalnego oraz uszkodzenia wątroby z wysokimi wartościami AST i ALT. Liczba

proliferyjących komórek owalnych systematycznie wzrasta, aby osiągnąć plateau w około 14 dniu podawania diety CDE. Należy podkreślić, iż zaprzestanie żywienia zwierząt dietą CDE stymuluje komórki do różnicowania się.

Endogenne czynniki modulujące aktywność komórek owalnych w przebiegu nowotworów wątroby

Dużą uwagę w badaniach dotyczących rozwoju raka przewodów żółciowych, jak i raka wątrobowokomórkowego, poświęca się endogennym czynnikom, które w sposób pośredni lub bezpośredni wpływają na rozwój nowotworu. Obok wielu cytokin, reaktywnych form tlenu czy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), należą do nich biorące udział w procesie zapalnym pochodne kwasu arachidonowego, np. prostaglandyny, jak również enzymy katalizujące ich syntezę, mianowicie cyklooksygenazy. Pomimo iż nie do końca wyjaśniony jest wpływ indukowanej przez różne czynniki (np. TNF α /THF-R1) cyklooksygenazy-2 (COX-2), enzymu katalizującego syntezę głównie prostaglandyny H, na proces karcynogenezy, wykazano silną korelację pomiędzy zwiększeniem aktywności COX-2 a powstawaniem wątrobowych guzów nowotworowych. Nasze badania potwierdziły nasilenie ekspresji tego enzymu zarówno w stanach inicjacji, promocji, jak i progresji raka przewodów żółciowych oraz

wykazały, iż spośród trzech analizowanych typów komórek jedynie wątrobowe makrofagi wykazują ekspresję COX-2. Hepatocyty oraz cholangiocyty zarówno w warunkach kontrolnych, jak i doświadczalnych pozostają negatywne. Wobec faktu, iż tylko wątrobowe makrofagi są źródłem COX-2 w przebiegu raka przewodów żółciowych, stosowanie selektywnych inhibitorów tego enzymu w odniesieniu do ich wpływu na aktywność komórek owalnych jako źródła nowotworu, okazuje się nieprzydatne.

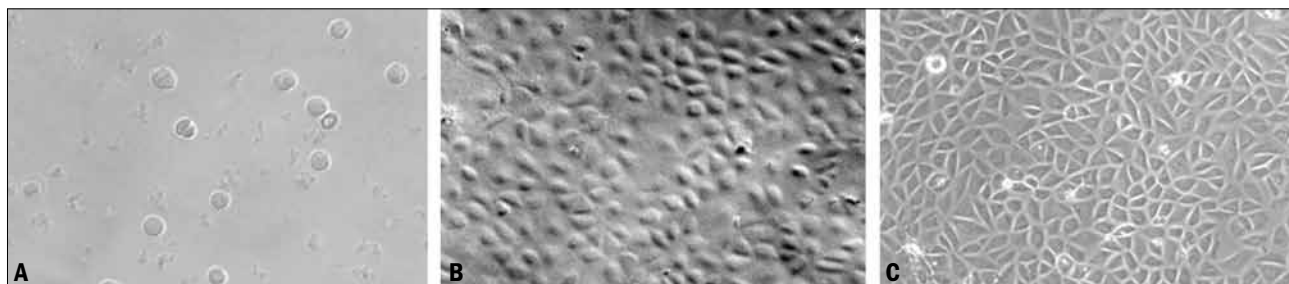
Innym, endogennym czynnikiem modulującym aktywność komórek owalnych w przebiegu hepatokarcynogenezy jest 2-metoksyestradiol (2-ME), naturalny metabolit 17 β -estradiolu. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na antyproliferyjny, nasilający różnicowanie i apoptozę wpływ 2-ME na neoplastyczne komórki owalne szczura, indukowane podawaniem diety CDE.

Egzogenne czynniki regulujące proliferację komórek owalnych

Do czynników, które mogą wpływać na rozwój różnych typów nowotworów u ludzi i zwierząt należą dodatki żywieniowe. Przyjmowanie wraz z pokarmem β -karotenu, jako aktywnej formy witaminy A, może działać bardziej przeciwnowotworowo niż przyjmowanie samej witaminy A (17). Dotychczasowe doświadczenia przeprowadzone na nowotworowych liniach komórkowych wskazują, iż β -karoten oraz inne niemające aktywności witaminy A karotenoidy, mogą indukować różnicowanie komórek, pełniąc tym samym prewencyjną rolę w preneoplastycznych uszkodzeniach wątroby. Nasze badania dotyczące modulującego wpływu β -karotenu i astaksantyny na aktywność proliferacyjną komórek owalnych pozyskanych z wątroby szczurów kontrolnych, poddanych hepatektomii oraz będących pod wpływem działania karcynogenu dietylnitrozoaminy (DEN), wykazały, iż obecność karotenów, niezależnie od posiadania przez nie aktywności witaminy A, istotnie hamowała proliferację komórek owalnych, jednocześnie nasilając ich różnicowanie, przede wszystkim do hepatocytów (ryc. 3). Efekt ten dotyczył zwłaszcza komórek owalnych uzyskanych od szczurów poddanych działaniu chemicznego karcynogenu (18).

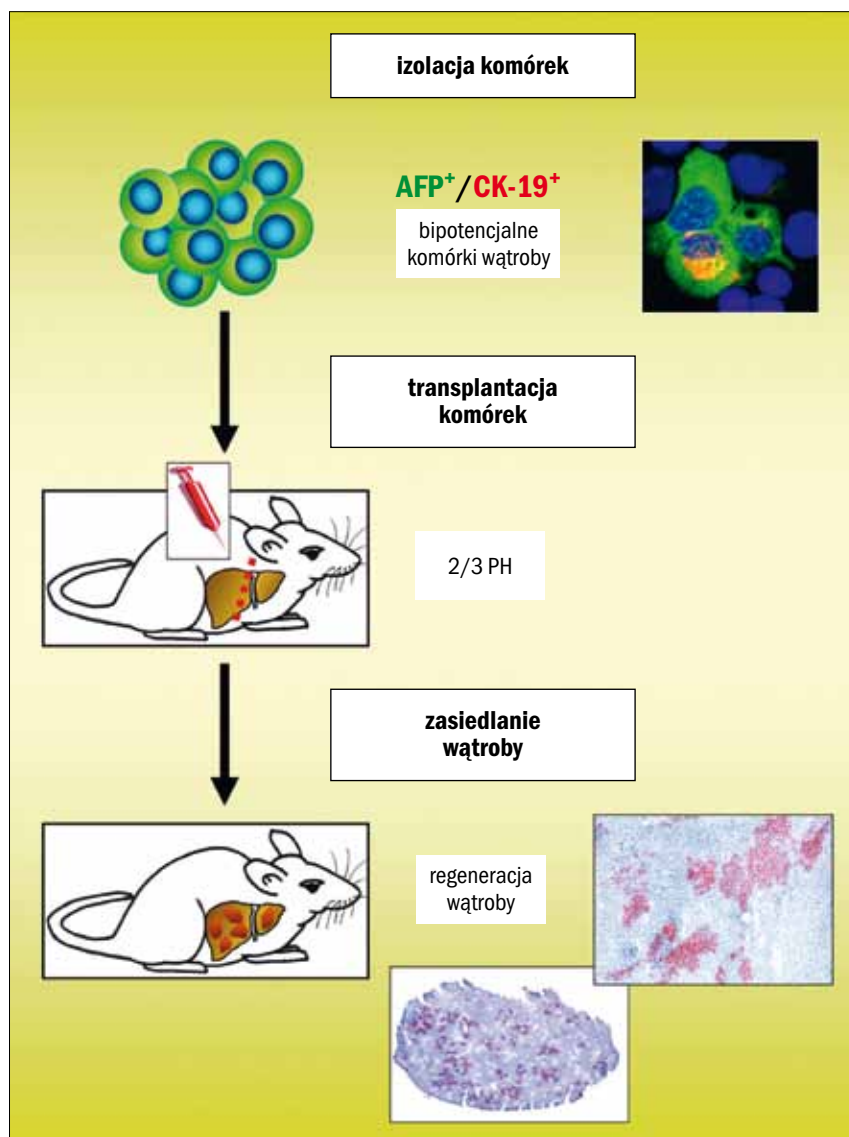
Wykorzystanie komórek owalnych w komórkowej transplantacji u ludzi i zwierząt

We wczesnym stadium rozwoju nowotworu wątroby jednym ze sposobów terapeutycznych jest częściowa resekcja wątroby.



Ryc. 3. Komórki owalne uzyskane od szczura poddanego działaniu chemicznego karcynogenu – dietylnitrozoaminy (DEN). A – Komórki owalne bezpośrednio po izolacji, B – 10-tygodniowa hodowla komórek owalnych bez dodatku karotenów do podłoża hodowlanego, C – 10-tygodniowa hodowla komórek owalnych z dodatkiem do podłoża hodowlanego astaksantyny. Komórki przyjmują charakterystyczny dla dojrzałych hepatocytów wielokątny kształt

Jednakże interwencja chirurgiczna nie zapobiega w pełni rozwojowi nowych ognisk neoplastycznych, skutkiem czego jest niejednokrotnie nawrót choroby (19, 20). Inną chirurgiczną metodą, która może być stosowana również w późniejszych etapach rozwoju guzów wątroby jest ortotopowa transplantacja narządu. Niestety nierozpoznane przed wykonaniem transplantacji mikroogniska przerzutowe i intensywne powikłania potransplantacyjne powodują wysoką śmiertelność pacjentów z przeszczepami wątroby (19, 20). Wobec trudności, na jakie napotyka przeszczep wątroby podjęto intensywne badania dotyczące transplantacji komórek owalnych wątroby, będącej alternatywną metodą leczenia, dającą możliwość przyczynowej terapii chorób wątroby (21). Na podstawie podjętych badań zrodziło się przypuszczenie, że przynajmniej w niektórych przypadkach możliwe będzie zastąpienie przeszczepu całego narządu wstrzyknięciem odpowiedniej liczebnie populacji komórek, które odbudują tkankę, przywracając wątrobie utraconą funkcję (ryc. 4). Należy też brać pod uwagę, iż w medycynie weterynaryjnej, gdzie przeszczepy narządowe nie mają zastosowania (głównie z powodu uwarunkowań ekonomicznych, braku dawcy oraz, co ma znaczenie u zwierząt gospodarskich, przedłużonego podawania środków immunosupresyjnych), transplantacje komórkowe mogłyby zostać wykorzystane jako skuteczne metody leczenia dotychczas nieuleczalnych chorób wątroby. Jak wykazano w pracach badawczych, metoda ta niesie ze sobą szereg korzyści. W związku z ograniczoną interwencją chirurgiczną jest metodą znacznie mniej inwazyjną, niewykazującą powikłań potransplantacyjnych. O ile wątroba musi być przeszczepiona w ciągu krótkiego czasu od pobrania od dawcy, o tyle wyizolowane komórki mogą być przechowywane przez dłuższy okres w ciekłym azocie. Ponadto wyizolowane od jednego dawcy komórki mogą być stosowane u wielu biorców (21, 22). Na podstawie dotychczasowych badań w zakresie transplantacji komórek wątroby wyróżniono trzy grupy



Ryc. 4. Model doświadczalny obrazujący repopulację komórek wątroby szczura po częściowej hepatektomii. AFP – alfafetoproteina, CK-19 – cytokeratyna -19, 2/3 PH – częściowa hepatektomia

chorób, w przebiegu których celowe jest wykorzystanie przeszczepu komórkowego (23). Należą do nich:

1. Ostra niewydolność wątroby charakteryzująca się gwałtownymi zaburzeniami prowadzącymi niejednokrotnie do śmierci pacjenta, jeśli nie zostanie u niego wykonana transplantacja narządu.
2. Nowotworowe oraz przewlekłe choroby wątroby przebiegające z postępującym

zwłóknieniem, prowadzącym do marskości wątroby.

3. Metaboliczne choroby wątroby charakteryzujące się wrodzonym defektem enzymów wątrobowych, prowadzące np. do zaburzeń cyklu mocznikowego czy metabolizmu bilirubiny.

Przeszczepienie komórek owalnych wątroby może przedłużyć utrzymanie się pacjenta przy życiu, jednocześnie łagodząc

skutki choroby, a wpływając na regenerację własnego narządu pozwoli uniknąć przeszczepu ortotopowego (22). Ponadto przeszczepiane komórki owalne mogą służyć jako nośniki wykorzystywane *ex vivo* w terapii genowej, proponowanej w stanach zaburzeń metabolicznych wątroby (24). Uzyskane przez nas pilotażowe wyniki w zakresie autologicznego wszczepiania transfekowanych wektorem pDsRedExpress komórek owalnych wskazują, iż, w przeciwieństwie do nowotworowych uszkodzeń wątroby, utrzymująca się na dobrym poziomie przeżywalność komórek owalnych w stanach nienowotworowych, przemawia za możliwością terapeutycznego wykorzystania tych komórek w regeneracji wątroby.

Piśmiennictwo

- Fausto N., Campbel J.S.: The role of hepatocytes and oval cell in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 2003, **120**, 117-130.
- Sell S.: Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2002, **13**, 419-424.
- Bergero D., Nervi J.: Hepatic diseases in horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2008, **92**, 345-355.
- Laconi E.: Differential growth: From carcinogenesis to liver repopulation. *Am. J. Pathol.* 2000, **156**, 389-392.
- Routhuizen J., Van den Ingh T.S.: Hepatitis in dog, a review. *Tijdschr Diergeneesk.* 1998, **15**, 246-252.
- Zimmermann A.: Liver regeneration. The emergence of new pathways. *Med. Sci. Monit.* 2002, **8**, 53-63.
- Roskams T.: Different types of liver progenitor cells and their niches. *J. Hepatol.* 2006, **45**, 1-4.
- Petersen B.E.: Hepatic stem cells: coming full circle. *Blood Cell. Mol. Dis.* 2001, **27**, 590-600.
- Sell S.: Heterogeneity and plasticity of hepatocytes lineage cells. *Hepatology* 2001, **33**, 2001, 738-750.
- Nagy P., Bisgaard H.C., Santoni-Rugiu E., Thorgeirsson S.N.: *In vivo* infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-Acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996, **23**, 71-79.
- Oh S.-I., Leather M., Iatch I., Petersen B.E.: Hepatic oval "stem" cell in liver regeneration. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2002, **13**, 405-409.
- Nguyen L.N., Furuya M.H., Wolfrain L.A., Nguyen A.P., Holdren M.S., Campbel J., Knight B., Yeoh G.C.T., Fausto N., Parks W.T.: Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007, **45**, 31-40.
- Cassiman D., Libbrecht L., Sinelli N., Desmet V., Denef C., Roskams T.: The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol* 2002, **16**, 521-530.
- Bisgaard H.C., Nagy P., Santoni-Rugiu E., Thorgeirsson S.S.: Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (Oval) cells to chemical carcinogens. *Hepatology* 1996, **23**, 62-70.
- Lowes K.N., Croager E.J., Olynyk J.K., Abraham L.J., Yeoh G. C.: Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003, **18**, 4-12.
- Libbrecht L., Roskams T.: Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2002, **13**, 389-396.
- Kurihara H., Koda H., Asami S., Kiso Y., Tanaka T.: Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.* 2002, **70**, 2509-2520.
- Wójcik M., Bobowiec R., Martelli F.: Effect of carotenoids on *in vitro* proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic injuries in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, **59**, 203-213.
- Roberts J.P., Liu T., Freise C.E., Mielczarek J., Ferrel L., Randal H., Ascher N.L.: Liver transplantation improves survival of rats bearing hepatoma-3924A. *J. Surg. Res.* 1996, **65**, 59-62.
- Warmann S.W., Fuchs J., Seitz G., Ruck P., Treuner C., Mahrt J., Müller G.A., Wessels J.T.: New trends in tumor biology: transfection of human hepatoblastoma cell line with green fluorescent protein. *J. Paediatr. Surg.* 2005, **40**, 653-657.
- Baccarani U., Adani G.L., Sainz M., Donini A., Risaliti A., Bresadola F.: Human hepatocyte transplantation for acute liver failure: state of the art and analysis of cell sources. *Transpl. Proc.* 2005, **37**, 2702-2704
- Gupta S., Chowdhury J.R.: Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2002, **13**, 439-446.
- Allen KJ, Buck NE, Williamson R. Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl. Immunol.* 2005, **15**, 99-112.
- Alison M., Sarraf C.: Hepatic stem cells. *J. Hepatol.* 1998, **29**, 676-682.
- Gaudio E., Carpino G., Cardinale V., Franchitto A., Orsi P., Alvaro D.: New insight into liver stem cells. *Dig. Liver Dis.* 2009, **41**, 455-462.