

Ανοσοϊστοχημική μελέτη της ενδοηπατικής νεύρωσης του ανθρώπου

Ντ. Τηνιακού¹, Α.Δ. Βούρ², Χ. Κίττας¹

Immunohistochemical study of intrahepatic innervation in man

D. Tiniakos¹, A.D. Burt², Chr. Kittas¹

¹Laboratory of Histology and Embryology, Medical School University of Athens, Greece,

²Department of Pathology, Royal Victoria Infirmary, Medical School University of Newcastle upon Tyne, U.K.

Introduction-Aim: Physiological studies have shown that intrahepatic nerves may have important metabolic, sensory and motor functions. The ontogenesis of intrinsic human liver innervation has not been studied in detail before and little is known about the distribution and nature of peptidergic nerves in adult liver.

Material and Methods: Normal human liver tissue from 14 fetuses and 10 adults was used in this study. Nerve fibers were identified in paraffin sections using immunohistochemical methods and a panel of antibodies to pan-neural markers (NSE, S100, chromogranin, PGP 9.5) and neuropeptides (NPY, somatostatin, galanin, CGRP).

Results: In human foetal liver, a neural network was established in the portal tracts at 20 weeks of gestation. The density of nerve fibres reached adult levels at 32nd-33rd week. Rare intra-acinar nerves appeared at 28 weeks and were restricted in the periportal areas. The peptidergic neural supply was abundant and diverse. Galaninergic and somatostatinergic fibers were noted in portal tracts from 22 weeks but were not identified in any of the adult livers. CGRP-positive fibers were noted in portal tracts from 32 weeks onwards. No intrasinusoidal peptidergic nerves could be identified. In human adult liver, a dense neural supply was observed in portal tracts and the acini, where intrasinusoidal nerves were most abundant in zone 1. Peptidergic innervation was characterized by NPY-ergic nerve fibers, which may belong to the extensive efferent sympathetic neural network observed in the mammalian liver.

Conclusions: Human foetal liver at 20 weeks of gestation is characterized by an intrinsic neural network distributed in portal tracts. The density of nerve fibers

¹Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, ²Department of Pathology, Royal Victoria Infirmary, University of Newcastle upon Tyne, U.K.

increases progressively towards term. Developmentally-regulated expression of galanin and somatostatin may play a role in liver morphogenesis. In adult liver, the presence of nerve fibers in portal tracts may play a role in blood haemodynamics and the direct innervation of hepatocytes may be related to the control of metabolic functions. Alterations in the distribution of intrahepatic nerves may contribute to the metabolic and haemodynamic disturbances which characterize chronic liver disease in man.

Key-words: human, liver, innervation, immunohistochemistry

Εισαγωγή-Σκοπός: Οι πληροφορίες που υπάρχουν σήμερα για την ανάπτυξη των νευρικών ινών στο ανθρώπινο ήπαρ κατά την ενδομήτρια ζωή είναι λιγοστές, ενώ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η ενδοηπατική νεύρωση του ενήλικα ανθρώπου. Ο σκοπός της εργασίας μας ήταν η εκτίμηση της οντογένεσης των νευρικών ινών στο ήπαρ του ανθρώπου και η μελέτη της ενδοηπατικής νεύρωσης στον ενήλικα με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων.

Υλικό-Μέθοδος: Μελετήσαμε τομές παραφίνης φυσιολογικού ήπατος 14 εμβρύων (ηλικίας 20-40 εβδομάδων κύησης) και 10 ενηλίκων ανθρώπων. Χρησιμοποιήσαμε τις τεχνικές συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης και υπεροξειδάσης-αντι-υπεροξειδάσης με μονοκλωνικά αντισώματα και πολυκλωνικούς αντιπορούς ειδικούς για νευρικούς δείκτες (NSE, S100, νευροϊνίδια, χρωμογρανίνη, PGP 9.5) και για τα νευροπεπτίδια: γαλανίνη, σωματοστατίνη, νευροπεπτίδιο Υ (NPY) και πεπτίδιο σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP).

Αποτελέσματα: Στο εμβρυϊκό ήπαρ του ανθρώπου, νευρικές ίνες παρατηρούνται στα πυλαία διαστήματα από την 20^η εβδομάδα κύησης και η πυκνότητά τους φθάνει στα επίπεδα του ενήλικα κατά την 32^η-33^η εβδομάδα. Λίγες ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες αναδείχθηκαν μετά την 28^η εβδομάδα. Γαλανινεργικές και σωματοστατινεργικές νευρικές ίνες ταυτοποιήθηκαν στα πυλαία διαστήματα μετά την 22^η εβδομάδα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στο ήπαρ ενήλικα. GCRP-εργικά νευρίδια ανιχνεύθηκαν στα πυλαία διαστήματα από την 32^η έως την 40^η εβδομάδα, ενώ NPY-εργικές ήταν ορατές μόνο στο ήπαρ τελειομήνων εμβρύων. Πεπτιδεργικές ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες δεν παρατηρήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ. Στον ενήλικα, το ήπαρ διαθέτει πλούσια νεύρωση στα πυλαία διαστήματα και στα ηπατικά λόβια. Οι ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες είναι πυκνότερες στις περιπυλαίες περιοχές. Η πεπτιδεργική νεύρωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία NPY-εργικών ινών, που θεωρείται ότι αποτελούν μέρος της απαγωγού συμπαθητικής νευρώσεως.

Συμπεράσματα: Το εμβρυϊκό ήπαρ στον άνθρωπο παρουσιάζει πλούσια νεύρωση μετά την 20^η εβδομάδα κύησης και παρατηρείται προοδευτική αύξηση στην πυκνότητα των νευρικών ινών μέχρι τον τοκετό. Η έκφραση της γαλανίνης και της σωματοστατίνης εξαρτάται από τη φάση ανάπτυξης και πιθανώς παίζει κάποιο ρόλο στη μορφογένεση του ήπατος, ενώ δεν φαίνεται να είναι σημαντική στο ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου. Η ενδοηπατική παρεγχυματική νεύρωση δεν θεωρείται απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος κατά την εμβρυϊκή ζωή, ενώ φαίνεται ότι παίζει ρόλο στον έλεγχο μεταβολικών λειτουργιών στο ήπαρ του ενήλικα. Οι μεταβολικές και αιμοδυναμικές διαταραχές που παρατηρούνται στη χρόνια ηπατική νόσο, ίσως αντανakλούν διαταραχές στην κατανομή της ενδοηπατικής νεύρωσης.

Λέξεις-κλειδιά: ήπαρ, νεύρωση, ανοσοϊστοχημεία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατανομή των ενδοηπατικών νευρικών ινών αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Οι παλαιότεροι ερευνητές χρησιμοποιούσαν τεχνικές μεταλλικού εμπλουτισμού (ιστοχημικές τεχνικές που βασίζοντο στη χρήση χρυσού, αργύρου ή οσμίου). Αυτές οι τεχνικές είχαν μικρή ευαισθησία και ειδικότητα λόγω της μη ειδικής σύνδεσης των μεταλλικών ουσιών με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Παρ' όλα αυτά, ο Pflüger το 1869 πρότεινε ότι νευρικές ίνες είναι δυνατόν να νευρώνουν απ' ευθείας τα παρεγχυματικά κύτταρα¹. Πολλά χρόνια αργότερα, η παρουσία ενδοκολλοειδικών νευρικών ινών στο ήπαρ πολλών ειδών ταυτοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικών μικροσκοπιών σάρωσης και διέλευσης^{2,3}. Στη συνέχεια, για τη μελέτη της φύσης των ενδοηπατικών νευρών χρησιμοποιήθηκαν ιστοχημικές μέθοδοι φθορισμού, με πιο διαδεδομένη την τεχνική Falck-Hillarp για την ανάδειξη αδρενεργικών ινών. Με αυτή τη μέθοδο, παρατηρήθηκαν αδρενεργικά νευρίδια στα πυλαία διαστήματα και σε μερικά είδη ταυτοποιήθηκαν και ενδοκολλοειδικές αδρενεργικές ίνες⁴. Ο Moghimzadeh και οι συνεργάτες του⁴ κατάδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δηλαστικών στην κατανομή των ενδοηπατικών νευρών, οι οποίες αποδόθηκαν σε διαφορές στα επίπεδα της χημικά ανιχνευόμενης νοραδρεναλίνης. Μερικά δηλαστικά, όπως ο αρουραίος, δεν παρουσιάζουν σημαντική ενδοκολλοειδική νεύρωση, ενώ αντίθετα άλλα, όπως το ινδικό χοιρίδιο και ο άνθρωπος, έχουν πλούσια (νορ)αδρενεργική παρεγχυματική νεύρωση.

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ανοσοϊστοχημείας επέτρεψε την ιστική ανίχνευση νευρικών δεικτών, ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση κατεχολαμινών και νευροπεπτιδίων, και έτσι πιστοποιήθηκε η παρουσία σημαντικών διαφορών στην έκταση της ενδοκολλοειδικής νεύρωσης μεταξύ των ειδών⁵⁻¹². Επίσης, αποδείχθηκε ότι οι περισσότερες παρεγχυματικές νευρικές ίνες του ήπατος των δηλαστικών είναι αδρεν/NPY-εργικές και αναδείχθηκε ένα πλούσιο ενδοπαρεγχυματικό δίκτυο πεπτιδεργικών ινών περιέχουσων σωματοστατίνη, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP), και ουσία P. Στο ήπαρ του αρουραίου αποδείχθηκε ότι τα περισσότερα από τα CGRP-εργικά νευρίδια και τα νευρίδια που περιείχαν ουσία P είναι στην ουσία

προσαγωγές νευρικές ίνες¹³.

Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι η κατανομή των νευρικών ινών στο ήπαρ του ανθρώπου μελετάται καλύτερα με τη συνδυασμένη χρήση αντισωμάτων προς γενικούς νευρικούς δείκτες, όπως PGP 9.5, S100 πρωτεΐνη, ειδική ενολάση των νευρώνων (NSE) και νευροϊνίδια. Με τη χρήση αυτών των αντισωμάτων, παρατηρήθηκε ελάττωση του αριθμού των ενδοκολλοειδικών νευρικών ινών στο κίρρωτικό ήπαρ, γεγονός που πιθανώς συμβάλλει στη διαταραχή της μεταβολικής λειτουργίας του οργάνου στα τελικά στάδια της ηπατικής νόσου^{10,14}. Παρ' όλα αυτά, με την εφαρμογή των ανωτέρω ανοσοϊστοχημικών τεχνικών αποδείχθηκε ότι το μεταμοσχευθέν ήπαρ παραμένει απονευρωμένο, τουλάχιστον όσον αφορά στις ενδοκολλοειδικές ίνες^{15,16}. Αυτό το εύρημα ίσως σημαίνει ότι τα ενδοηπατικά νεύρα δεν είναι απολύτως αναγκαία για τη φυσιολογική ηπατική λειτουργία, αν και συνεχίζουν να θεωρούνται σημαντικά για την επιτέλεση λεπτών ρυθμίσεων.

Μέχρι σήμερα, δεν έχουν δημοσιευθεί πλήρεις μελέτες της οντογένεσης της ενδοηπατικής νεύρωσης του ανθρώπου, ενώ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η κατανομή της πεπτιδεργικής νευρώσεως στο ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη της κατανομής και της φύσης των νευρικών ινών στο εμβρυϊκό ήπαρ και στο ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό μας αποτελείτο από φυσιολογικό ηπατικό ιστό 14 εμβρύων ανθρώπου (ηλικίας κυήσεως 20-40 εβδομάδων, Πίνακας 1), που απεβλήθησαν αυτόματα ή για θεραπευτικούς σκοπούς, και 10 υγιών ενηλίκων ανθρώπων. Χρησιμοποιήθηκαν ιστικές τομές πάχους 5μm, μονιμοποιημένες σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης ή διάλυμα Bouin's και εγκλεισμένες σε παραφίνη. Σε δύο περιπτώσεις ήπατος ενήλικα, τα δείγματα προήρχοντο από πτωματικούς δότες νεφρικών μοσχευμάτων και αυτά μονιμοποιήθηκαν με ενδαγγειακή έγχυση διαλύματος παραφορμαλδεΐδης 2% σε 0,1 mmol/l διαλύματος PBS (phosphate buffer saline). Όλες οι τομές επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με πολυ-L-λυσίνη (Sigma, Saint Louis, U.S.A.).

Πίνακας 1. Κατανομή των 14 μελετηθέντων εμβρύων ανά ηλικία κυήσεως

Εβδομάδα κυήσεως	Αριθμός περιπτώσεων
20 ^η	2
22 ^η	1
26 ^η	1
28 ^η	1
29 ^η	2
30 ^η	1
32 ^η	2
33 ^η	1
39 ^η	1
40 ^η	2

Εφαρμόσθηκαν οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές υπεροξειδάσης-αντι-υπεροξειδάσης (PAP) με πολυκλωνικούς αντιπορούς έναντι γενικών νευρικών δεικτών και ειδικών νευροπεπτιδίων και η τεχνική συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτινής (ABC) με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού προς τη χρωμογρανίνη (Πίνακας 1). Το χρωμογόνο εκλογής ήταν η 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB) με επαύξηση νικελίου σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη.¹⁷ Όλα τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα, πλην των ειδικών για την PGP 9.5 και την πρωτεΐνη S100, ήταν ευγενική προσφορά της J.M. Polak, Dept. Of Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, London U.K. (Πίνακας 2).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο ήπαρ του ενήλικα, η πυκνότητα και η κατανομή των νευρικών ινών που ταυτοποιήθηκαν με τους γενικούς νευρικούς δείκτες ήταν παρόμοιες με τις περιγραφείσες σε προηγούμενες μελέτες και χαρακτηρίζοντο από πυκνή νεύρωση των πυλαίων διασθημάτων (κυρίως

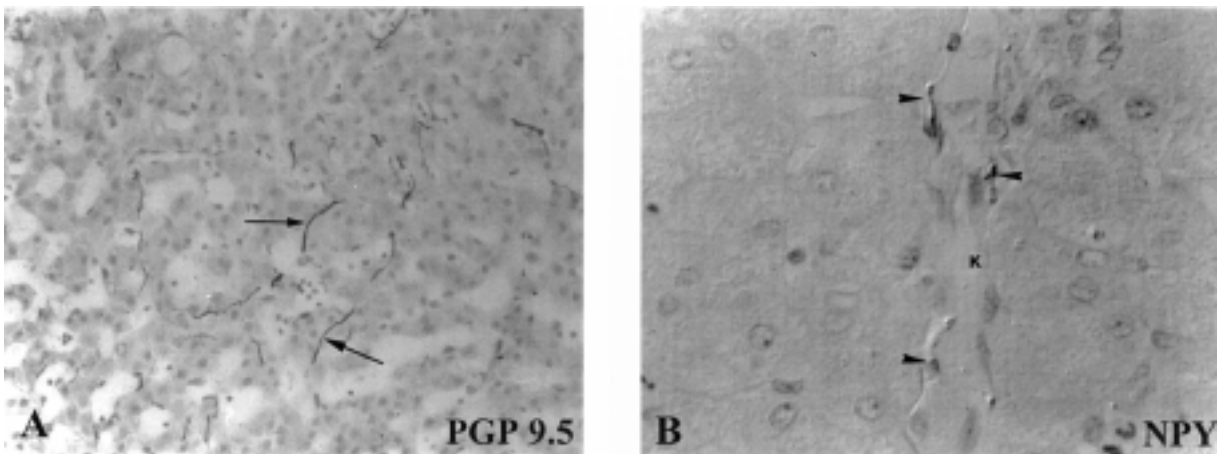
γύρω από τους κλάδους αιμοφόρων αγγείων και λιγότερο γύρω από χοληφόρα αγγεία) αλλά και των ηπατικών λοβίων (Εικόνα 1). Στα λοβία, νευρικές ίνες ανιχνεύθηκαν ενδοκολλοειδικά και μεταξύ των ηπατοκυττάρων και ήταν περισσότερες στην περιπυλαία ζώνη (ζώνη 1). Μερικές νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν μέσα στο τοίχωμα των τελικών ηπατικών φλεβών, εύρημα που δεν ανιχνεύθηκε στο εμβρυϊκό ήπαρ. Κύτταρα δετικά προς τη χρωμογρανίνη δεν παρατηρήθηκαν στο φυσιολογικό ήπαρ ενήλικα.

Στο εμβρυϊκό ήπαρ, με την εφαρμογή των γενικών νευρικών δεικτών NSE, NF, χρωμογρανίνη, PGP 9.5 και S100 από τις 20 εβδομάδες και μετά ανιχνεύθηκαν νευρικές ίνες στα πυλαία διαστήματα με αυξανόμενη πυκνότητα, οι οποίες εμφανίζονταν πιο πολυάριθμες με τη χρήση του αντισώματος για την PGP 9.5. Κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου κυήσεως συνεχίσθηκε η αύξηση στον αριθμό των ινών, η δε πυκνότητά τους έφθασε στα επίπεδα ενήλικα κατά την 32^η-33^η εβδομάδα. Οι νευρικές ίνες εντοπιζόνταν κυρίως γύρω από τους κλάδους της ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας. Λίγες ίνες παρατηρήθηκαν κοντά σε χοληφόρα αγγεία και σε επαφή με το παρακείμενο στα πυλαία διαστήματα λοβιακό ηπατικό παρέγχυμα (Εικόνα 2). Λιγαστές ενδοκολλοειδικές νευρικές ίνες ανιχνεύθηκαν μετά την 28^η εβδομάδα κυήσεως και παρέμειναν αραιές μέχρι τον τοκετό. Κύτταρα δετικά προς τη χρωμογρανίνη δεν παρατηρήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ.

Γαλανινεργικά νεύρα παρατηρήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ στα πυλαία διαστήματα από την 22^η εβδομάδα κυήσεως έως τον τοκετό, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ ενήλικα (Εικόνα 3A). Σωματοστατινεργικά νεύρα ταυτοποιήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ μόνο μεταξύ 26^{ης} και 33^{ης} εβδομάδας και ήταν απόντα στο

Πίνακας 2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική μελέτη

Αντισώματα ειδικά προς	Αραίωση	Πηγή
PGP 9.5	1:20	Ultraclone, U.K.
Πρωτεΐνη S100	1:500	Dako, UK
NSE (ειδική ενολάση νευρώνων-neurone specific enolase)	1:1200	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
NF (νευροϊνίδια-neurofilaments)	1:1500	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
Χρωμογρανίνη A	1:500	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
Neuropeptide Y (NPY)	1:1500	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
Σωματοστατίνη	1:2500	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
Γαλανίνη	1:2500	J.M. Polak (RPMS, London, UK)
Πεπτιδίο σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (Calcitonin gene related peptide-CGRP)	1:750	J.M. Polak (RPMS, London, UK)



Εικόνα 1. Ήπαρ ενήλικα ανθρώπου. **A.** Ανάδειξη ενδοηπατικών νευρικών ινών δετικών προς PGP 9.5 (βέλη) μεταξύ των ηπατοκυττάρων και κατά μήκος των κολποειδών, χρωμογόνο DAB-νικέλιο, μεγέθυνση X100, **B.** NPY-εργική νευρική ίνα (κεφαλές βελών) εκτεινόμενη κατά μήκος του τοιχώματος ενός κολποειδούς στη ζώνη 1, χρωμογόνο DAB, μεγέθυνση X400, φίλτρο Normanski.

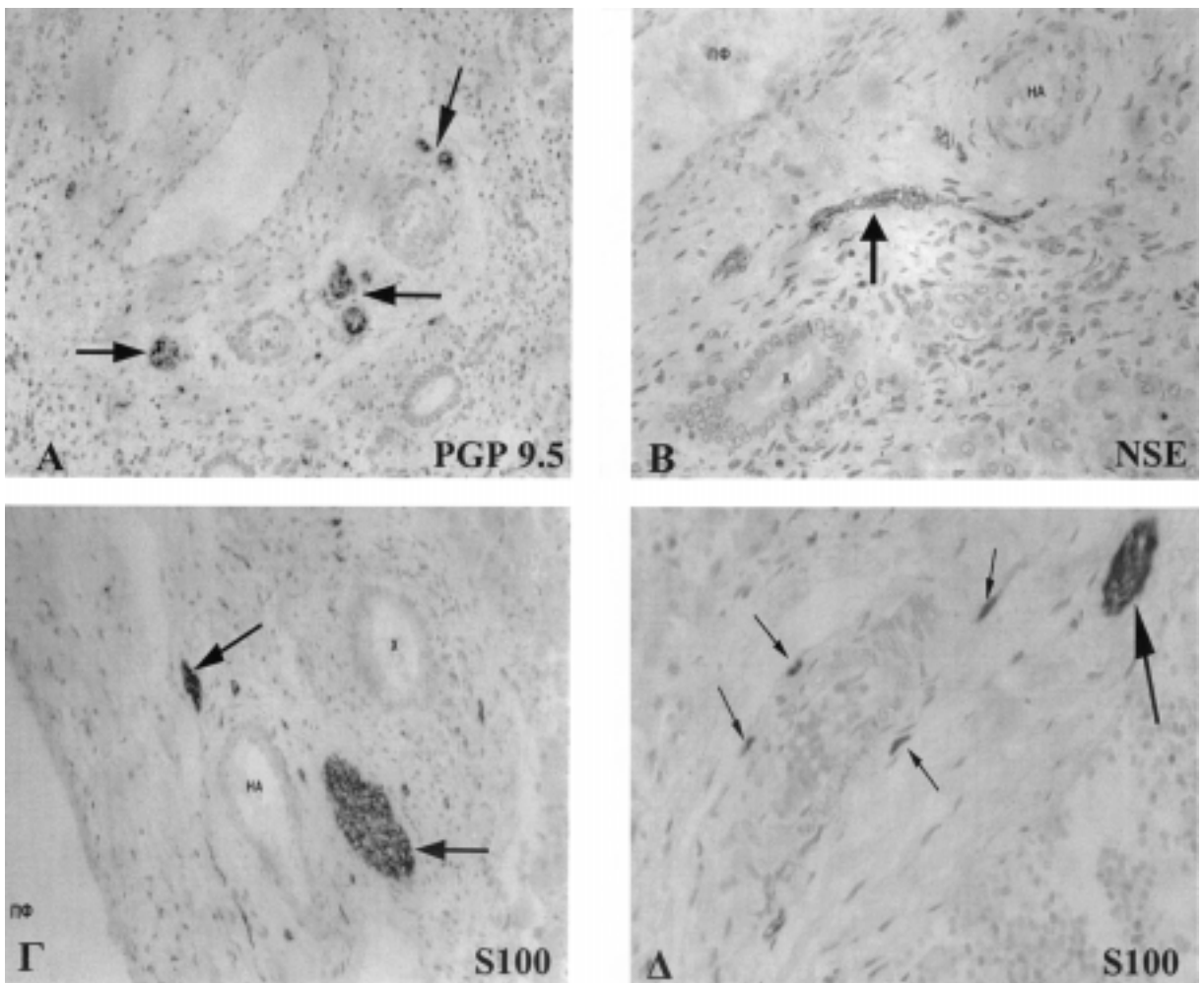
ήπαρ ενήλικα (Εικόνα 3B). Η κατανομή των γαλανινεργικών και σωματοστατινεργικών ινών ήταν παρόμοια και αφορούσε κυρίως δέσεις γύρω από κλάδους της ηπατικής αρτηρίας, λιγότερο γύρω από τους κλάδους της πυλαίας, ενώ ήταν αραιή γύρω από χοληφόρα αγγεία. Μελέτη διαδοχικών τομών έδειξε ότι η ειδική ανοσοχρώση της σωματοστατινής εντοπιζόταν, σε πολλές δέσεις, στις ίδιες νευρικές ίνες με την της γαλανίνης. Μετά την 32^η εβδομάδα δεν παρατηρήθηκαν σωματοστατινεργικές ίνες γύρω από τους μικρούς χοληφόρους πόρους. Νευρικές ίνες δετικές στο CGRP παρατηρήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ μόνο μεταξύ 32^{ης} εβδομάδας και τέλους κύησης, ενώ απουσίαζαν στο ήπαρ ενήλικα. NPY-εργικές ίνες δεν ανιχνεύθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ μέχρι την 38^η εβδομάδα, αλλά παρατηρήθηκαν στο ήπαρ εμβρύων 38-40 εβδομάδων και σε όλες τις περιπτώσεις ήπατος ενηλίκων. Ενδοκολποειδικές πεπτιδεργικές νευρικές ίνες δεν ταυτοποιήθηκαν στο εμβρυϊκό ήπαρ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τη μελέτη της κατανομής και της πυκνότητας των ενδοηπατικών νευρικών δεικτών είναι η ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση των παν-νευρικών δεικτών PGP 9.5 και S100¹⁰. Στη μελέτη μας, η πυκνότητα των PGP 9.5-δετικών νευρικών ινών ήταν μεγαλύτερη από την των S100-δετικών ινών. Αντίθετα με την PGP 9.5, η S100 δεν εντοπίζεται στο αξονόπλασμα των νευρικών κυττάρων,

αλλά στα περιβάλλοντα κύτταρα Schwann. Σύμφωνα με μελέτες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, οι ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες στο ανθρώπινο ήπαρ περιβάλλονται μόνο μερικώς από προσεκβολές κυττάρων Schwann εξηγώντας έτσι την παρουσία λιγότερων S100-δετικών νευριδίων στο ηπατικό παρέγχυμα του ενήλικα¹⁸.

Τα ευρήματά μας με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών στο φυσιολογικό ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου είναι παρόμοια με τα ήδη δημοσιευθέντα και αναδεικνύουν ένα πλούσιο νευρικό δίκτυο στα πυλαία διαστήματα, κυρίως γύρω από αγγειακές δομές¹⁹⁻²⁵. Νευρικές ίνες δετικές προς PGP 9.5, NSE και NPY, ταυτοποιήθηκαν ενδοηπατικά μεταξύ των ηπατοκυττάρων, κατά μήκος των τοιχωμάτων των κολποειδών και στο χώρο του Disse, καθώς επίσης και στα τοιχώματα των τελικών ηπατικών φλεβιδίων. Το τελευταίο εύρημα δείχνει ότι μερικά νεύρα είναι δυνατό να εισέρχονται στο ήπαρ μαζί με τις μείζονες ηπατικές φλέβες¹⁰. Η ενδοηπατική κατανομή των νευρικών ινών στο ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου είναι παρόμοια με την περιγραφείσα στο ήπαρ του ινδικού χοιριδίου⁵ και εμφανίζεται πυκνότερη στην περιπυλαία περιοχή (ζώνη 1). Η στενή επαφή των νευρικών ινών με τα ηπατοκύτταρα φαίνεται ότι σχετίζεται με τη δράση τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, η δε κατανομή τους στα πυλαία διαστήματα αντανακλά την αιμοδυναμική τους δράση. Οι ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού των υδα-

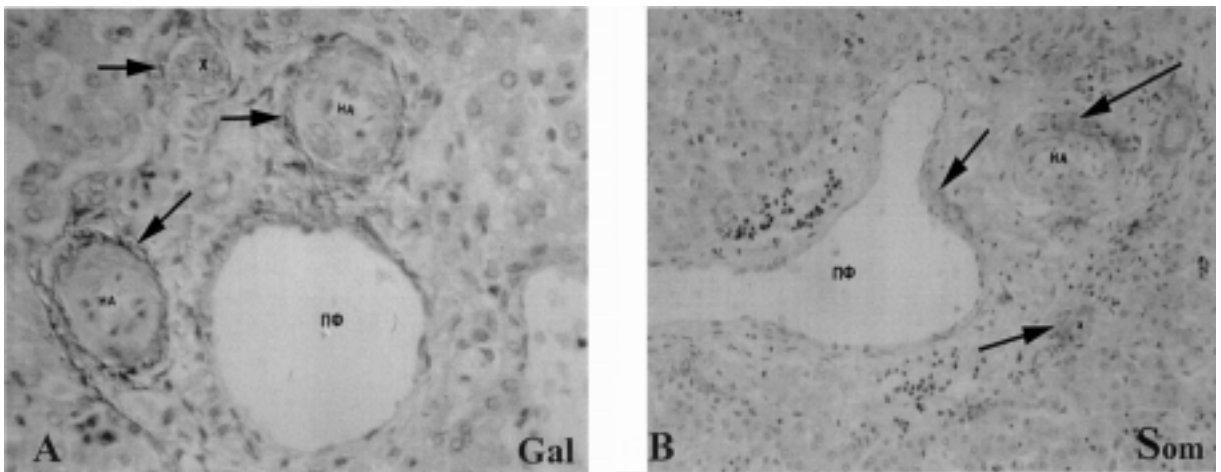


Εικόνα 2. Α, Β. Ήπαρ εμβρύου 29 εβδομάδων. Νευρικές δεσμίδες (βέλη) και ινίδια δετικά προς την PGP 9.5 (Α) και NSE (Β) σε ένα πυλαίο διάστημα (ΠΦ πυλαία φλέβα, ΗΑ ηπατική αρτηρία, Χ χοληφόρο αγγείο), **Γ, Δ.** Ήπαρ εμβρύου 33 εβδομάδων. S100-δετικές νευρικές δεσμίδες (βέλη) σε πυλαίο διάστημα (Γ). Νευρικές ίνες στο τοίχωμα ηπατικής αρτηρίας (Δ, λεπτά βέλη) πιθανώς προερχόμενες από παρακείμενη νευρική δεσμίδα (Δ, παχύ βέλος), χρωμογόνο DAB-νικέλιο, μεγέθυνση X100 (Α), X200 (Β,Γ), X400 (Δ).

τανδράκων και των λιπιδίων και στην αναγέννηση του ήπατος^{3,5}. Η λειτουργική σχέση των ενδολοβιακών νευρικών ινών με τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (περικολποειδικά κύτταρα του χώρου του Disse ή κύτταρα Ito) δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί. Πολλά στοιχεία υποστηρίζουν ότι τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα, τα οποία είναι δυνατόν να παρουσιάζουν χαρακτηριστικές μυοϊνοβλαστών, παίζουν ρόλο στη δυναμική ρύθμιση της κολποειδικής αιματικής ροής, κυρίως λόγω της δυνατότητάς τους να συστέλλονται³. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι οι ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες ελαττώνονται σε πυκνότητα κατά την προκίρρωτική φάση της χρόνιας ηπατικής νόσου και εξαφανίζονται

κατά την κίρρωση^{10,14,19,25}. Είναι πιθανό ότι στη χρόνια ηπατική νόσο τα νεύρα καταστρέφονται λόγω της προοδευτικής ινώσεως στο χώρο του Disse. Η οξώδης αναγέννηση του ήπατος, η οποία είναι απαραίτητο στοιχείο για την εγκαθίδρυση κίρρωσεως, ίσως συμμετέχει στην απονεύρωση των κολποειδών. Η διακοπή της φυσιολογικής νευρικής τροφοδότησης των κολποειδών είναι δυνατόν να συμβάλλει στις μεταβολικές διαταραχές που παρατηρούνται στα τελικά στάδια της ηπατικής νόσου και στις αλλαγές της ενδοηπατικής αιματικής ροής κατά την κίρρωση, οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη πυλαίας υπερτάσεως.

Αντίθετα με το εμβρυϊκό ήπαρ, νευρικές



Εικόνα 3. Α. Ήπαρ εμβρύου 32 εβδομάδων Γαλανινεργικές νευρικές ίνες (βέλη) με χαρακτηριστική κατανομή σε ένα πυλαίο διάστημα: πυκνή νεύρωση κλάδων ηπατικής αρτηρίας (HA), αραιότερη νεύρωση κλάδου πυλαίας φλέβας (ΠΦ) και χοληφόρου αγγείου (X), χρωμογόνο DAB, μεγέθυνση X400, φίλτρο Normanski, **Β.** Ήπαρ εμβρύου 29 εβδομάδων. Σωματοστατινεργικές νευρικές ίνες σε ένα πυλαίο διάστημα, χρωμογόνο DAB, μεγέθυνση X200.

ίνες δετικές προς CGRP, σωματοστατίνη και γαλανίνη δεν ταυτοποιήθηκαν στο ήπαρ του ενήλικα. Αν και αυτό το εύρημα είναι δυνατόν να αντανakλά διαφορές στη μονιμοποίηση των ιστών, είναι πιθανό αυτές οι πεπτιδεργικές ίνες να μην παίζουν ρόλο στη λειτουργία του ήπατος κατά την ενήλικη ζωή. Σε πρόσφατη εργασία τους σε ήπαρ ενήλικα ανθρώπου, οι Akiyoshi και συν. ανέφεραν την παρουσία CGRP-εργικών νευρικών ινών στα πυλαία διαστήματα, κυρίως γύρω από χοληφόρα αγγεία²³, εύρημα που πιθανώς να οφείλεται στη χρήση διαφορετικού αντισώματος από αυτό της δικής μας μελέτης ή σε διαφορές στη μονιμοποίηση του υλικού. Στο φυσιολογικό ήπαρ ενήλικα, παρατηρήθηκαν NPY-εργικές ίνες, με κατανομή παρόμοια με την αναφερόμενη σε άλλες μελέτες^{19,23,24,31}, ενώ ήταν απύσες στο εμβρυϊκό ήπαρ σε όλα τα μελετηθέντα στάδια της ανάπτυξης. Φαίνεται ότι η ενδοηπατική πεπτιδεργική νεύρωση στο έμβρυο και τον ενήλικα σχετίζεται με ειδικές φυσιολογικές λειτουργίες απαραίτητες μόνο στην εμβρυϊκή ζωή και τη ζωή μετά τη γέννηση αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματά μας, το εμβρυϊκό ήπαρ του ανθρώπου χαρακτηρίζεται από εμφανή νεύρωση ήδη από το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, η οποία γίνεται όλο και πυκνότερη μέχρι την 32η-33^η εβδομάδα που φθάνει στα επίπεδα του ενήλικα. Οι νευρικές ίνες στα πυλαία διαστήματα κατανέμονται κυρίως γύρω από τους κλάδους της

ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας. Οι ενδοκολποειδικές νευρικές ίνες φαίνεται ότι είναι ελάχιστες πριν τη γέννηση, όπως ανέδειξε η εφαρμογή παν-νευρικών δεικτών, ενώ πεπτιδεργικά ινίδια δεν αναδείχθηκαν στα κολποειδή. Η σημασία των ενδοκολποειδικών νευρών στον έλεγχο της μεταβολικής λειτουργίας του ήπατος δεν είναι γνωστή. Δεν παρατηρούνται στο απονευρωμένο μεταμοσχευθέν ήπαρ^{15,16} και παρόλα αυτά τα μοσχεύματα φαίνεται σε γενικές γραμμές να λειτουργούν σωστά. Πάντως, στο μεταμοσχευθέν ήπαρ παρατηρούνται μικρές αιμοδυναμικές διαταραχές και είναι πιθανό ο ρόλος των ενδοκολποειδικών νευρικών ινών να αφορά στη λεπτή ρύθμιση της ενδοηπατικής αιματικής ροής και της μεταβολικής λειτουργίας συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού της γλυκόζης. Η απουσία ενδοκολποειδικών νευρικών ινών στο εμβρυϊκό ήπαρ υποδηλώνει ότι ίσως δεν είναι αναγκαίες για τη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος κατά την ενδομήτρια ζωή.

Προηγούμενες μελέτες σε άλλους ανθρώπινους ιστούς έχουν δείξει την παρουσία νευροπεπτιδίων νωρίς κατά την εμβρυϊκή ζωή²⁶. Κατά την ανάπτυξη των εντερικών ρυθμιστικών πεπτιδίων, η σωματοστατίνη εμφανίζεται πρώτη την 8η εβδομάδα της κύησης και μόνο κατά την 24η εβδομάδα τα νευροενδοκρινικά κύτταρα του εντέρου παρουσιάζουν κατανομή νευροπεπτιδίων παρόμοια με αυτή του ενήλικα²⁷. Στην παρούσα μελέτη, η οποία είναι η

πρώτη που στοιχειοθετεί την ανάπτυξη της ενδοηπατικής πεπτιδεργικής νευρώσεως, δείξαμε ότι τα ενδοηπατικά πεπτιδεργικά νεύρα εμφανίζονται αργότερα κατά την κύηση και ότι ορισμένα νευροπεπτίδια εκφράζονται μόνο παροδικά κατά την ανάπτυξη του εμβρυϊκού ήπατος. Γαλανινεργικά και σωματοστατινεργικά νευρίδια ταυτοποιήθηκαν στα πυλαία διαστήματα σε καθορισμένες περιόδους της εμβρυϊκής ζωής και πιστεύουμε ότι αυτή η παροδική παρουσία τους παίζει σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση²⁸. Η πυκνή κατανομή των γαλανινεργικών ινών γύρω από τους κλάδους της ηπατικής αρτηρίας, δείχνει ότι ίσως παίζουν ρόλο στον έλεγχο της αρτηριακής αιματικής ροής, η οποία στο ήπαρ των ενήλικων θηλαστικών βρίσκεται κάτω από αδρενεργικό έλεγχο²⁹. Η παρουσία της σωματοστατίνης στο περιφερικό νευρικό σύστημα είναι συνδεδεμένη με αισθητικές λειτουργίες³⁰. Η ύπαρξη σωματοστατινεργικών νευρών γύρω από τους κλάδους της ηπατικής αρτηρίας στο εμβρυϊκό ήπαρ, υποδηλώνει ότι ίσως αποτελούν προσαγωγές αισθητικές ίνες, οι οποίες μεταφέρουν μηνύματα από ηπατικούς αισθητικούς υποδοχείς στον εγκέφαλο. CGRP-εργικά νεύρα άρχισαν να παρατηρούνται στα πυλαία διαστήματα μετά την 32^η εβδομάδα κυήσεως και ίσως εξυπηρετούν αισθητικές λειτουργίες στο εμβρυϊκό ήπαρ, όπως και στο ήπαρ του αρουραίου και του ινδικού χοιριδίου. NPY-εργικές ενδοηπατικές νευρικές ίνες παρατηρήθηκαν μόνο σε τελειόμηνα έμβρυα, αν και σύμφωνα με πρόσφατη οντογενετική μελέτη είναι παρούσες κατά την ανάπτυξη του ήπατος σε πολλά είδη σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, όχι μόνο στα πυλαία διαστήματα αλλά και σε στενή σχέση με τα ηπατοκύτταρα³¹.

Η Roskams και συν, ανέφεραν την παρουσία μεμονωμένων ηπατοκυττάρων δετικών προς τη χρωμογρανίνη Α σε περιπτώσεις μακροχρόνιας χολόστασης καθώς και μικρά δετικά κύτταρα σε περιπυλαίες περιοχές σε περιπτώσεις αναγέννησης του ήπατος και δέωσαν ότι αυτά σχετίζονται με τα "αρχέγονα ηπατικά κύτταρα" (liver stem cells).^{32,33} Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα δετικά στη χρωμογρανίνη, και κατά συνέπεια νευροενδοκρινικής φύσεως, στο φυσιολογικό ήπαρ του ενήλικα ανθρώπου. Παρομοίως, στο εμβρυϊκό ήπαρ πέραν των 20 εβδομάδων κυήσεως δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα περιέχοντα χρωμογρανίνη. Πάντως, θα ήταν ενδιαφέ-

ρον να μελετηθεί η παρουσία νευροενδοκρινικών κυττάρων στο ήπαρ εμβρύων μικρότερης ηλικίας, κατά την αρχική φάση ανάπτυξης των πυλαίων διαστημάτων και τον σχηματισμό των κοληφόρων αγγείων (ductal plate formation).

Οι εμβρυϊκοί ιστοί που χρησιμοποιούνται σε οντογενετικές μελέτες σαν την παρούσα δεν είναι ιδανικά διατηρημένοι εξ αιτίας των συνθηκών της συλλογής τους και η πιθανότητα αυτολύσεως των νευρικών πρωτεϊνών και ρυθμιστικών πεπτιδίων δεν είναι αμελητέα. Νέες μελέτες με τη χρήση προσεκτικά συλλεγμένου υλικού από εμβρυϊκό ήπαρ θηλαστικών με δίκτυο παρεγχυματικής νεύρωσης παρόμοιο με του ανθρώπου (π.χ. ήπαρ ινδικού χοιριδίου) είναι αναγκαίες. Παρόλα αυτά, πιστεύουμε ότι τα ευρήματα της μελέτης μας δείχνουν ότι το εμβρυϊκό ήπαρ παρουσιάζει εκτεταμένη νεύρωση ήδη από το δεύτερο τρίμηνο της κυήσεως και ότι η πεπτιδεργική νεύρωση είναι σημαντική για τη μορφογένεση στο τρίτο τρίμηνο της κυήσεως.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pflüger E. Ueber die abhængigkeit der leber von dem nervensystem. Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen Tiere (Pflügers) 2:459-461, 1869.
2. Skaarring P, Bierring F. Further evidence for the existence of intralobular nerves in the rat liver. Cell Tissue Res 177:287-290, 1977.
3. Bioulac-Sage P, Lafon ME, Saric J, Balabaud C. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. J Hepatol 10:105-112, 1990.
4. Moghimzadeh E, Nobin A, Rosengren E. Fluorescent microscopical and chemical characterization of the adrenergic innervation in mammalian liver tissue. Cell Tissue Res 230:605-613, 1983.
5. Burt AD, Tiniakos D, MacSween RNM, Griffiths MR, Wisse E, Polak JM. Localization of adrenergic and neuropeptide tyrosine-containing nerves in the mammalian liver. Hepatology 9:839-845, 1989.
6. Goehler LE, Sternini. Neuropeptide Y immunoreactivity in the mammalian liver: pattern of innervation and coexistence with tyrosine hydroxylase immunoreactivity. Cell Tissue Res 265:287-295, 1991.
7. Sasaki Y, Kamada T, Hayashi N, Sato N, Kasahara A, Fusamoto H, Shiosaka S, Tohyama M, Shiotani Y. Immunohistochemical distribution of glucagon, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in hepatic vasculature of the

- rat. *Hepatology* 4:1184-1189, 1984.
8. Goehler LE, Sternini C, Brecha NC. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the biliary pathway and liver of the guinea pig: distribution and colocalization with substance P. *Cell Tissue Res* 253:145-150, 1988.
 9. Feher E, Fodor M, Feher J. Ultrastructural localisation of somatostatin- and substance P immunoreactive nerve fibers in the feline liver. *Gastroenterology* 102:287-294, 1992.
 10. Lee JA, Ahmed Q, Hines JE, Burt AD. Disappearance of hepatic parenchymal nerves in human liver cirrhosis. *Gut* 33:87-91, 1992.
 11. Amenta F, Cavallotti C, Ferrante F, Anelli F. Cholinergic nerves in the human liver. *Histochem J* 13 :419-424, 1981
 12. el-Sahly M, Stenling R, Grimelius R. Peptidergic innervation and endocrine cells in human liver. *Scand J Gastroenterol* 28:809-815, 1993.
 13. Magni F, Carobi C. The afferent and preganglionic parasympathetic innervation of the rat liver, demonstrated retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Sys* 8:237-260, 1983.
 14. Jaskiewicz K, Voigt MD, Robson SC. Distribution of hepatic nerve fibers in liver diseases. *Digestion* 55:247-252, 1994.
 15. Boon AP, Hubscher SG, Lee JA, Hines JE, Burt AD. Hepatic reinnervation following liver transplantation in man. *J Pathol* 167:217-222, 1992.
 16. Kjaer M, Jurlander J, Keiding S, Galbo H, Kirkegaard P, Hage E. No reinnervation of hepatic sympathetic nerves after liver transplantation in human subjects. *J Hepatol* 20:97-100, 1994.
 17. Mathew J, Hines JE, James OFW, Burt AD. Non-parenchymal cell responses in paracetamol (acetaminophen)-induced liver injury. *J Hepatol* 20:537-541, 1994.
 18. Lafon ME, Bioulac-Sage P, LeBail B. Nerves and perisinusoidal cells in human liver. In: *Cells of the hepatic sinuoid*, Wisse E, Knook DL, Decker K (eds). Kuppfer cell foundation, Rijswijk 1989:230-234.
 19. Miyazawa Y, Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, Nagura H. Immunohistochemical studies on the distribution of nerve fibers in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 83:1108-1114, 1988.
 20. Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, et al. Distribution of substance P and VIP in the human liver. *Am J Gastroenterol* 86:1633-1637, 1991.
 21. Lin YS, Nosaka S, Amakata Y, Maeda T. Comparative study of the mammalian liver innervation: an immunohistochemical study of PGP 9.5, dopamine-beta-hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110:289-298, 1995.
 22. Fukuda Y, Imoto M, Koyama Y, Miyazawa Y, Hayakawa T. Demonstration of noradrenaline-immunoreactive nerve fibers in the liver. *J Int Med Res* 24:466-472, 1996.
 23. Akiyoshi H, Gonda T, Terada T. A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig and human livers. *Liver* 18:352-359, 1998.
 24. Stoyanova II, Gulubova MV. Peptidergic nerve fibers in the human liver. *Acta Histochem* 100:245-256, 1998.
 25. Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 94:1923-1932, 1999.
 26. Johnston MV, Silverstein FS. Development of neurotransmitters. In: *Fetal and neonatal physiology*, Polin RA, Fox WW (eds). W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto, 1992:1519-1525.
 27. Bryant MG, Buchan AMJ, Gregor M, Ghatei MA, Polak JM, Bloom SR. Development of intestinal regulatory peptides in the human fetus. *Gastroenterology* 83:47-54, 1982.
 28. Tiniakos D, Tiniakos G, Burt AD. Peptidergic innervation of human fetal liver. *J Hepatol* 21 suppl 1:S73, 1994.
 29. Lutt WW. Neural activation of α -adrenoreceptors in glucose mobilization from liver. *Can J Physiol Pharmacol* 57:1037-1039, 1979.
 30. Tessler A, Himes BT, Gruber-Bollinger J, Reichlin S. Characterisation of forms of immunoreactive somatostatin in sensory neurons and normal and deafferented spinal cord. *Brain Res* 370:232-240, 1989.
 31. Ding WG, Kitasato H, Kimura H. Development of neuropeptide Y innervation in the liver. *Microsc Res Tech* 15:365-371, 1997.
 32. Roskams T, De Vos R, van der Oord JJ, Desmet VJ. Cells with neuroendocrine features in regenerating human liver. *APMIS suppl.*23:32-39, 1991.
 33. Roskams T, Desmet VJ. Parathyroid hormone-related peptide and development of intrahepatic bile ducts in man. *Int Hepatol Commun* 2:121-127, 1994.

Corresponding author

D. Tiniakos, MD, PhD

*Lab. of Histology and Embryology
Medical School, Athen's University*

75 Mikras Asias str.

11527 Athens, Greece

Tel.: +3 0107796425, FAX: +3 0107462340