

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Lékařská chemie a biochemie

**VLASTNOSTI A APOPTÓZA JATERNÍCH HVĚZDICOVÝCH
BUNĚK V CIRHOTICKÝCH JÁTRECH POTKANŮ**

**GENERAL FEATURES OF HEPATIC STELLATE CELLS
UNDERGOING APOPTOSIS IN CIRRHOTIC RAT LIVER**

Mgr. LENKA BITTNEROVÁ

Školitel: doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ 2013

Obhajoba dne

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 2013

Úvodem bych ráda poděkovala všem svým kolegům a spolupracovníkům, kteří jakoukoli měrou přispěli k vytvoření této práce.

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu doc. RNDr. Jiřímu Kantovi, CSc., nejen za odborné vedení práce, předání znalostí v oblasti jaterních hvězdicových buněk a jaterní fibrózy, ale také za řadu cenných zkušeností aplikovatelných v běžném životě.

Paní doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD., přednostce Ústavu lékařské biochemie, za předání řady přínosných poznatků. Stejně tak doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi, CSc. a doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc. za vstřícnost, podporu a vytvoření milého pracovního prostředí.

Dále pak prof. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D. za zasvěcení do světa fluorescenční mikroskopie.

Zejména pak Mgr. Aleně Mrkvicové, PhD., za blízkou spolupráci a neutuchající podporu, jež přispěla v mnohém ke vzniku této práce. Jsem ráda, že jsem měla tu čest ji poznat a spolupracovat s ní jak po stránce odborné, tak zároveň i po té lidské.

Chci poděkovat všem laborantkám za jejich vstřícnost, ochotu a spolupráci, hlavně Mileně Hajzlerové nejen za pomoc při pokusech, ale zejména za její lidský rozměr a podporu. Dále i laborantkám z vivária LFHK Lence Kriesfaluyové a Dagmar Ježkové za pomoc při práci s potkany.

V neposlední řadě chci poděkovat celé svojí rodině za jejich trpělivost, optimismus, morální podporu a dodání sil.

Moc děkuji všem!

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE.....	10
3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	11
3.1. Játro.....	11
3.2. Jaterní fibróza a cirhóza.....	12
3.2.1. Patofyziologický mechanismus fibrózy jater	13
3.2.2. Buňky produkující jaterní extracelulární matrix	14
3.3. Extracelulární matrix	15
3.3.1. Složení extracelulární matrix.....	15
3.3.2. Extracelulární matrix v poškozených játrech	17
3.4. Jaterní hvězdicové buňky	19
3.4.1. Funkce HSC v normálních játrech.....	20
3.4.2. Funkce HSC v akutně poškozených játrech	21
3.4.3. Osud HSC	23
3.4.4. Apoptóza HSC	24
3.5. Reverzibilita jaterní fibrózy a cirhózy	26
3.6. Experimentální modely navození apoptózy HSC.....	29
3.6.1. Tetrachlormethanový model.....	30
3.6.2. Apoptóza vyvolána pomocí toxinů.....	30
4. METODICKÁ ČÁST	32
4.1. Laboratorní potkani, tetrachlormethan a perfuze jater	32
4.2. Izolace a kultivace jaterních hvězdicových buněk	32
4.3. Histologické zpracování jaterní tkáně, imunocytochemie.....	33
4.4. Detekce apoptózy pomocí fluorescenční mikroskopie	34
4.5. Průtoková cytometrie.....	34
4.6. Analýza DNA fragmentů gelovou elektroforézou.....	35
4.7. Izolace RNA	35
4.8. Multiplexní analýza exprese apoptotických genů	36
4.9. Vyvolání apoptózy pomocí toxinů	36
4.10. Stanovení aktivity laktát dehydrogenázy	39
4.11. Statistická analýza	39

5. VÝSLEDKY	40
5.1. Histologie normálních a akutně poškozených jater	40
5.2. Charakteristika klidových a aktivovaných hvězdicových buněk.....	40
5.2.1. Testování dávkovacích schémat CCl ₄	42
5.2.2. Morfologie N HSC a C3 HSC na plastu a na kolagenním gelu.....	42
5.2.3. Imunocytochemický průkaz hladkosvalového α - aktinu	43
5.2.4. Proliferace N HSC a C3 HSC na plastu a na kolagenním gelu	46
5.3. Analýza N HSC pomocí průtokové cytometrie	47
5.4. Stanovení apoptózy C3 HSC	47
5.4.1. Fluorescenční značení.....	48
5.4.2. Průtoková cytometrie.....	49
5.5. Analýza exprese genů u N HSC a C3 HSC	49
5.5.1. Multiplexní analýza exprese genů pomocí oligo cDNA čipů.....	50
5.5.2. Průkaz apoptotických proteinů pomocí imunocytochemie.....	55
5.6. Vliv kolagenního gelu na apoptózu vyvolanou pomocí toxinů	56
6. DISKUSE.....	61
7. SHRUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	68
8. ZÁVĚR	69
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70
10. LITERATURA.....	72
11. PŘÍLOHY	85

1. ÚVOD

Jaterní cirhóza představuje časté a závažné onemocnění, v České republice umírá ročně 20,3 / 100 000 obyvatel, do konečného stadia dospěje asi 1 500 – 2 000 nemocných. Studium v posledních třech dekádách značně přispělo k objasnění jejího složitého mechanismu a nové metody přinesly řadu cenných poznatků o její patogenezi (Příbramská, 2007). Jaterní fibróza je charakterizovaná nadměrným hromaděním mezibuněčné hmoty a vzniká v důsledku působení nejrozličnějších příčin či podnětů. Její příčinou jsou chronická jaterní onemocnění, jako virová či autoimunitní hepatitida, abúzus alkoholu, účinky toxinů či biliární poškození. Klinické projevy jsou variabilní a jsou ovlivněny typem, projevy a pokročilostí základního onemocnění. Cirhózu definujeme jako konečné stadium fibrózy jaterního parenchymu vyústující do uzlové přestavby jater s následnou poruchou jejich funkce.

Začátek fibrogenese je spojen s akutním poškozením jater, dochází k nekróze hepatocytů, což vede k aktivaci jaterních hvězdicových buněk, ale i celé řady dalších buněk a ke vzniku zánětu. S přetrvávajícím poškozením dochází k selhání regeneračních schopností a hepatocyty jsou nahrazovány nově vytvořenou extracelulární matrix, která se v játrech hromadí, ukládá a způsobuje jejich přestavbu. Hlavními producenti kolagenu typu I a dalších složek matrix jsou jaterní hvězdicové buňky, které hrají v procesu fibrogenese zásadní roli. V poraněných játrech se aktivují, množí a mimo tvorbu matrix uvolňují řadu profibrogenních cytokinů, metaloproteináz a inhibitorů matrix-degradujících enzymů, které jsou pro celý proces nezbytné.

Dříve byly oba stavy považovány za nevratné, nicméně o reverzibilitě fibrózy i cirhózy se ve vědeckých kruzích hojně diskutuje a probíhá celá řada studií zaměřených na návrat do původního stavu. Z dnešního pohledu je fibróza vnímaná jako dynamický proces, který vede nejen k novotvorbě extracelulární matrix, ale zároveň i k její degradaci. Jednou z cest jak obnovit rovnováhu v játrech je odstranění hlavních producentů extracelulární matrix programovanou buněčnou smrtí – apoptózou. Proto je navození či ovlivnění apoptózy hvězdicových buněk v dnešní době významným, strategicko-terapeutickým, antifibrotickým cílem. Nemalý vliv se přisuzuje interakci hvězdicových buněk a extracelulární matrix. Novotvorba, přestavba či degradace matrix může ovlivnit další osud buněk v játrech, ať již směrem k proliferaci, návratu do klidového stavu či k buněčné smrti.

2. CÍLE PRÁCE

Naším cílem bylo sledovat vliv trojrozměrné kolagenní matrix na apoptózu jaterních hvězdicových buněk a přispět tak, k objasnění dějů probíhajících v játrech během fibrotického procesu.

Kladli jsme si za cíl:

- Izolovat hvězdicové buňky z nepoškozených jater a zároveň z jater akutně poškozených. Charakterizovat tyto buňky z hlediska morfologie, růstu a buněčného cyklu.
- Vytvořit model vhodný ke studium apoptózy jaterních hvězdicových buněk – in vivo za pomoci tetrachlormethanu nebo in vitro indukci apoptózy za pomoci toxinů.
- Zjistit, jaký je vliv kolagenu typu I na apoptózu jaterních hvězdicových buněk a analyzovat geny s apoptózou asociované.

3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

3.1. Játra

Funkce jater je nezaměnitelná a mnohostranná. Většina procesů v nich probíhajících souvisí s metabolismem a detoxikací organismu, ale kromě toho jsou játra též exokrinní i endokrinní žláza zasahující do dalších dějů. Játra jsou klíčovým orgánem zajišťujícím energetickou látkovou výměnu a přeměnu živin. Syntetizují řadu životně důležitých sloučenin jako například bílkoviny krevní plazmy (albumin), proteiny akutní fáze a koagulační proteiny. Zároveň jsou i zásobárnou vitaminů, železa a mědi. Vyrábějí žluč, která napomáhá rozkladu tuků v trávicím traktu, zasahují do metabolismu cukrů a regulují hladinu glukózy. Jsou největším vnitřním orgánem v lidském těle (tvoří 5 % tělesné váhy), a proteče jimi 1,5 l krve/min. Z anatomického hlediska se lidská játra rozdělují na 4 laloky: větší pravý lalok (*lobus dexter*), menší levý lalok (*lobus sinister*), dále pak na ocasatý lalok (*lobus caudatus*) a čtyřhranný lalok (*lobus quadratus*). Zdravá játra jsou tuhá ale zároveň křehká, poddajné konzistence a červenohnědé barvy.

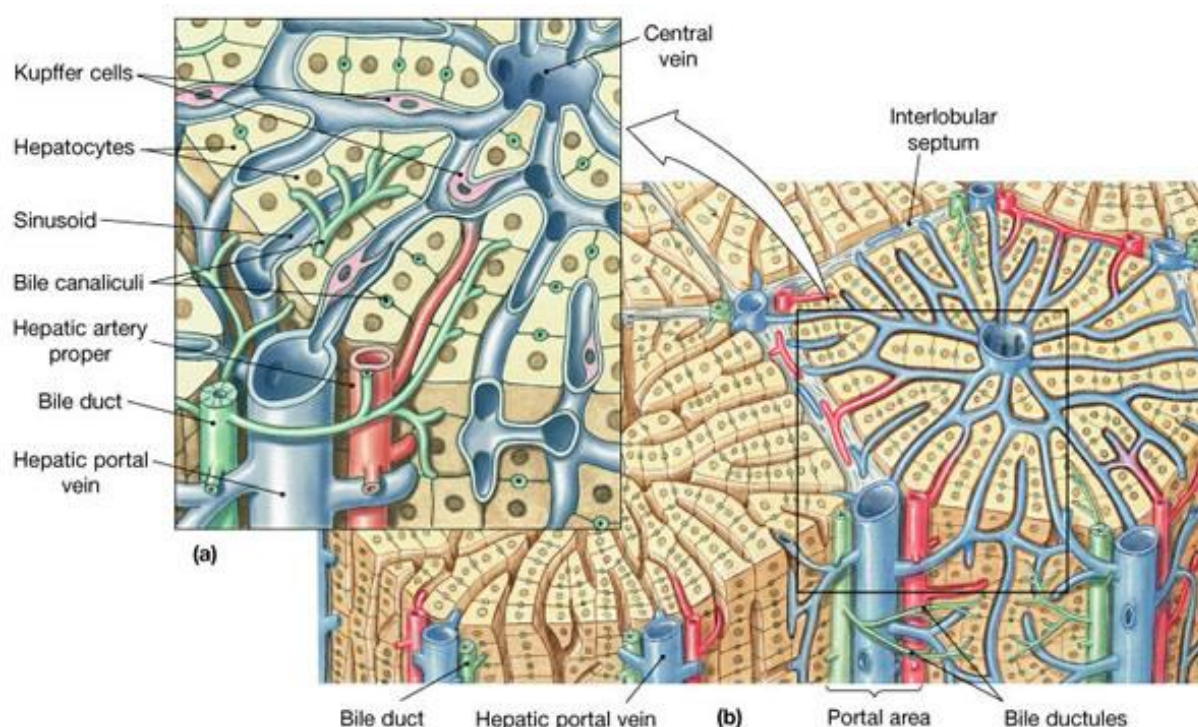


Schéma č. 1. Na obrázku vidíme jaterní lalůček ve tvaru šestiúhelníku, v jehož středu je *vena centralis* a v rozích portální triáda (*arteria hepatica propria*, větve *vena portae* a větve intraheptálních žlučových cest). Dále jsou zde zobrazené hepatocyty, Kupfferovy buňky, sinusoidy, žlučové kanálky. (Převzato z <http://www.as.miami.edu/chemistry/2086/Chap%2024/Chapter%2024-newPART2.htm>).

Jaterní parenchym je tvořen převážně hepatocyty, které vytvářejí trámce. Mezi těmito trámcí jsou fenestrovány sinusoidy, kudy přichází okysličená krev z *arteria hepatica propria* a živiny z *vena portae*. Krev se vylévá do Disseho prostoru (perisinusoidového), který zajišťuje kontakt krve s mikrokly hepatocytů. Morfologickou jednotku tvoří cévy vytvářející s trámcí radiálně uspořádaný útvar *lobulus venae centralis* s centrální žílou uprostřed, která probíhá osou lalůčku (Schéma č. 1). Ta sbírá krev ze sinusoid, kterou odvádí pryč z jater. Hepatocyty tvoří 60 - 70 % buněčné populace jaterního parenchymu, kromě nich nalézáme v játrech buňky neparenchymové - jaterní hvězdicové buňky (HSC), Kupfferovy buňky (tkáňové makrofágy), cholangiocyty, endotelové buňky a lymfocyty (Alpini, 1994).

3.2. Jaterní fibróza a cirhóza

Jaterní cirhóza patří mezi nejsledovanější choroby trávicího systému. Její složitý mechanismus byl v posledních letech intenzivně studován a nové metody přinesly řadu cenných poznatků o její patogenezi. Jaterní fibróza je dynamická a vysoce regulovaná odpověď na poškození jaterních buněk a jejich nahrazení tkání bohatou na extracelulární matrix (ECM). Fibróza může nastat z mnoha příčin a jakýmkoli procesem, který naruší rovnováhu vnitřního prostředí. Je způsobena zánětlivými, virovými a autoimunitními onemocněními, metabolity, nevhodnou stravou, vrozenými poruchami látkového metabolismu, dále vlivem abusu alkoholu, drog, léků, toxických látek či biliárního poškození. Klinické projevy jsou variabilní, záleží na příčině onemocnění, jeho typu a pokročilosti. Nejzávažnějším následkem jaterní fibrózy je portální hypertenze a komplikace spojené s tímto syndromem. Progredující fibróza může vyústit v cirhózu, což je konečné, pravděpodobně nevratné stadium fibrotizace jater spojené s tvorbou uzlovitých regenerativních struktur. Dochází k syntetické i metabolické dysfunkci a narušení transportu řady látek ze sinusoid k hepatocytům, může dojít k úplnému rozvratu a poté až k jaternímu selhání (Lotersztajn, 2005).

Onemocnění jater je v populaci čím dál častější, celosvětově je nyní celkově na desátém místě ze všech příčin mortality, přičemž přibližně 50 % jsou cirhózy alkoholového původu, asi 30 % připadá na virové a zbytek se týká všech ostatních jaterních onemocnění. Úmrtnost v ČR se pohybuje kolem 20 na 100.000 obyvatel. V posledních dvou desetiletích došlo k trvalému nárůstu počtu úmrtí v důsledku infekce hepatitidou C a s obezitou spojených nemocí (nealkoholické steatózy, NASH), což do budoucna predikuje i nadále zvyšující se úmrtnost a posun v pořadí směrem vzhůru. Problémem je, že nástup fibrózy je obvykle nenápadný a nedetekovatelný, většina komplikací či dokonce úmrtí je spojena až s progredující cirhózou,

neboť téměř 40 % pacientů s cirhózou jater je asymptomatických (Baigrie, 2005). Teprve po uplynutí latentního období (někdy 10 - 15 let) jsou zjistitelné první projevy cirhózy. Alkohol a jeho vliv na játra byl znám již ve starověkém Řecku a Indii. Patogeneze alkoholických jaterních poškození není stále jasná, a to i přes to, že představuje polovinu všech jaterních chorob. Většina alkoholiků má hepatomegalii v důsledku steatózy, ale jen u 20 - 35 % z nich vznikne fibróza nebo cirhóza. Nekroptické nálezy prokazují jaterní cirhózu jen u 18 % alkoholiků a biopticky je cirhóza potvrzena u 15 - 30 % alkoholiků. Vznik jaterní cirhózy koreluje s množstvím a délkou konzumace alkoholu. Relativní riziko vzniku jaterní cirhózy je při konzumaci 40 - 60 g alkoholu denně u mužů šestkrát vyšší než při konzumaci 20 g. Dnes se považuje 60 g alkoholu denně pro muže a 30 g pro ženy za dávku, která po 10 - 15 letech vede ke vzniku jaterní cirhózy (Příbramská, 2007, Špičák, 2008).

Cirhózu lze klasifikovat dle morfologie nebo dle etiologie. Dle morfologicko - anatomických změn rozeznáváme tři typy cirhózy: mikronodulární, makronodulární a smíšený typ. Zlatým standardem pro detekci jaterní fibrózy je jaterní biopsie, nicméně tato histologická metoda není pro pacienta úplně bez rizika a také je diagnosticky limitována omezeným množstvím selektivně vybraných vzorků. Bohužel zatím nebyla nalezena snadná, bezpečná, neinvazivní a spolehlivá diagnostická metoda, která by byla schopná odhalit fibrózu již v raném stadiu. Jedinou úspěšnou léčbou v dnešní době je včasné odstranění příčin poškození a vysoká regenerační schopnost jater, v druhém případě pak transplantace jater spojená s vysokým rizikem posttransplantačních komplikací.

3.2.1. Patofyziologický mechanismus fibrózy jater

Hepatocyty reagují na poškození masivní nekrózou nebo apoptózou a vznikem zánětu, který aktivuje proces hemokoagulace a fibrinolytický systém. Posléze dochází k subendotelovému ukládání nově vytvořené EMC v Disseho prostoru, mizí charakteristická fenestrace sinusoid, které tím nabývají charakteru kapilár. Jednotlivé složky extracelulární matrix jako kolagen, proteoglykany a adhezivní glykoproteiny jsou ukládány do jaterního parenchymu, akumulují se zde a způsobují změnu v jeho stavbě, a zároveň ovlivňují chování všech buněk jaterního parenchymu (Schéma č. 2). Tvorba vaziva, jeho ukládání (fibrogenese) a odbourávání (fibrolýza) jsou za fyziologického stavu vyrovnané. Porucha této homeostázy vede nejen k patologické fibrogenezi, která je charakterizována několikanásobným zmnožením mezibuněčné hmoty kolagenního i nekolagenního původu, ale také ke změněnému podílu mezi nimi. Pokud však poškození trvá i nadále, regenerační schopnost jater selhává, poškozené

hepatocyty jsou nahrazovány nově vytvořenou ECM, která má rozdílnou distribuci dle původu poškození jater. S pokračující fibrotizací tkáně postupně dochází k přechodu ve steatózu a centrilobulární nekrózy, vzniklé vazivové pruhy přemostňují septa, a dochází k tvorbě regeneračních uzlů a k vzniku cirhózy (Mudu, 2007). V poslední fázi jsou tyto změny považovány převážně za ireverzibilní.

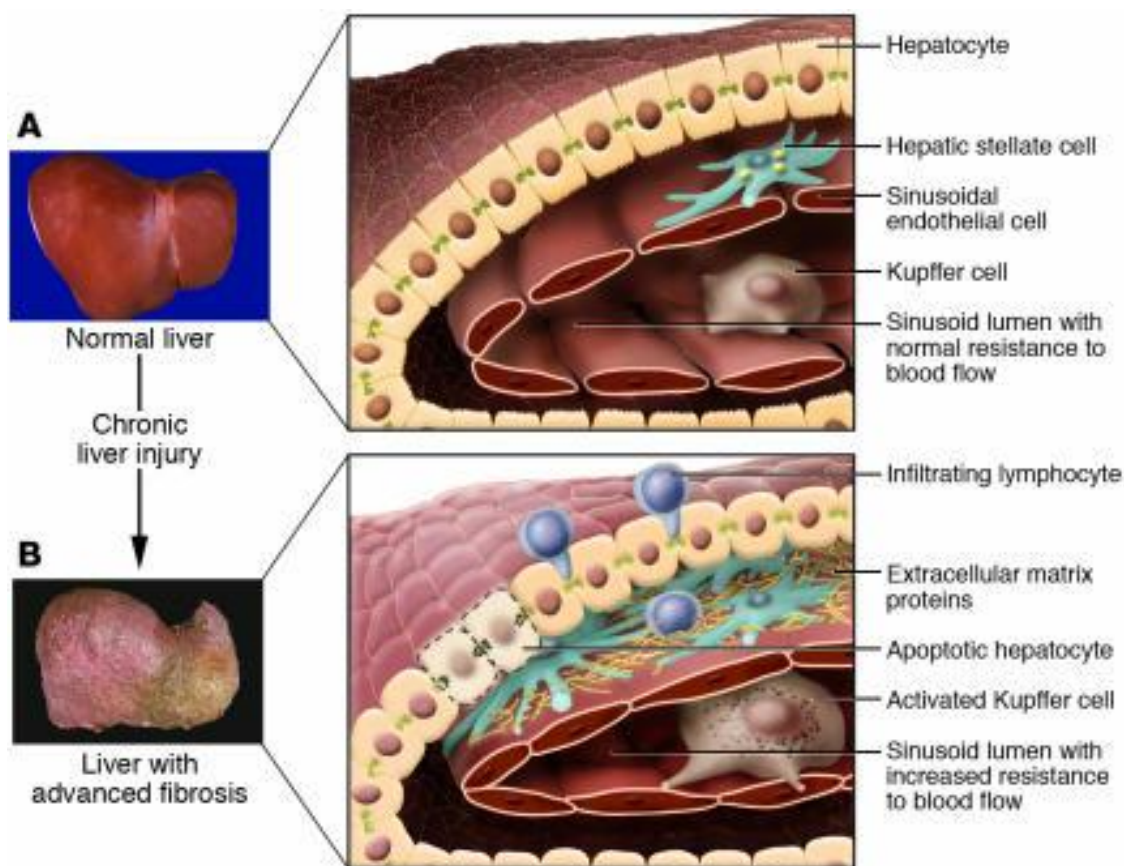


Schéma č. 2. Normální jaterní architektura (A) a změny spojené s pokročilou jaterní fibrózou (B). Po chronickém poškození jater dojde k infiltraci parenchymu lymfocyty a vzniku zánětu. Dochází k apoptóze některých hepatocytů, aktivaci Kupfferových buněk a uvolnění fibrogenních mediátorů. HSC se aktivují v kontraktilní myofibroblasty, prolifерují a produkují velké množství extracelulární matrix. (Převzato z Battaller, 2005).

3.2.2. Buňky produkující jaterní extracelulární matrix

Fibróza je tedy výsledkem reparačních procesů doprovázejících hepatocelulární poškození. Tento proces je lokalizován do subendotelového Disseho prostoru. Účastní se ho celá řada biologických a chemických účastníků (chemokinů, růstových faktorů, cytokinů) a každý z nich zasahuje svým zvláštním mechanismem. Klíčovou roli zde hrají hlavní producenti

extracelulární matrix - jaterní hvězdčkové buňky, které se během poškození jater aktivují, proliferují a produkují ECM ve zvýšeném množství (Sarem, 2006). Dalšími prokázanými zdroji ECM v játrech jsou portální, septální a tzv. interface myofibroblasty. Portální myofibroblasty jsou lokalizovány kolem malých portálních cév a drobných žlučovodů, proliferují u chronických cholestatických lézí a iniciují ukládání kolagenu (Kinnman, 2002, Magness, 2004). Okolo nově vytvořených sept jsou lokalizovány septální myofibroblasty. Navzájem se liší v expresi specifických buněčných markerů a v odpovědi na apoptotické stimuly (Knittel, 1999). Původ poněkud odlišné subpopulace interface myofibroblastů ještě není dořešen, jsou umístěné mezi parenchymem a stromatem portálních polí či sept. Pro tyto tři druhy buněk (HSC, portální a interface-myofibroblasty) byl navržen společný termín jaterní myofibroblast.

3.3. Extracelulární matrix

Jaterní extracelulární matrix je komplikovanou strukturou makromolekul, která je produkována buňkami mesenchymálního původu a je zcela nezbytná pro správnou funkci všech jaterních buněk. ECM zaujímá ve zdravých játrech méně než 3 %. Jde o několik typů kolagenů, proteoglykanů, glykoproteidů, glykosaminoglykanů a dalších proteinů, které mají v játrech kromě mechanického udržení struktury tkáně celou řadu dalších funkcí. Umožňuje migraci buněk, ale působí též jako informační systém, v němž buňky mohou detekovat, koordinovat nebo vytvářet chemické signály. Největší množství ECM je ve zdravých játrech lokalizováno v portálním traktu, kolem stěn sinusoid a centrální vény, kde slouží jako mechanická opora (Sato, 2004).

3.3.1. Složení extracelulární matrix

Normální i patologická ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty. Jsou zde zastoupeny tři hlavní typy makromolekul: **fibrilární proteiny** (kolageny poskytující pevnost a elastin skýtající pružnost), **glykosaminoglykany a proteoglykany** (které dodávají pojivové tkáni gelovou strukturu) a **multiadhezní molekuly** (kupř. fibronectin, laminin a nidogen, které umožňují přímé spojení buněk s makromolekulami ECM).

Nejhojnějším proteinem lidského těla je **kolagen** – tvoří asi 30 % jeho suché váhy. Je vysoce stabilní, mechanicky odolný a pevný, jeho vlákno vytváří trojrozměrnou šroubovici. Hlavní aminokyseliny pro jeho tvorbu jsou: glycin (33,5 %), prolin (12 %) a hydroxyprolin (14 %). Dvě aminokyseliny typické pro kolagen - hydroxyprolin a hydroxylysin vznikají hydroxylací prolinu a lysinu, které jsou již zabudovány ve vznikajícím polypeptidu a slouží ke

stabilizaci trojšroubovice. Základní proteinovou jednotkou kolagenu je molekula tropokolagenu, která je tvořena třemi spirálovitě stočenými polypeptidovými řetězci. Molekuly tropokolagenu polymerují do lineární protofibrily, ty se sdružují v kolagenní mikrofibrilu o průměru 20 - 100 nm. Z mikrofibril se skládají kolagenní fibrily o průměru 0,3 - 2 μm , svazky kolagenních fibril tvoří kolagenní vlákno (*fibra collagena*) o tloušťce 5 - 15 μm a "nekonečné" délce.

Doposud bylo identifikováno 19 různých kolagenů (typ I až XIX). Ve zdravých játrech jsou nejvíce zastoupené typy I, III, V a XI, které jsou uloženy zejména v pouzdře, v okolí velkých cév a portálních polí. Méně vláken obsahující typ I a III je v subendotelových prostorech. Kolagen typu I vytváří fibrilární makromolekuly, kolagen IV vytváří síť a je hlavním typem kolagenu ECM v Disseho prostoru, která svým složením připomíná basální membránu (Schuppan, 2001).

Hydrofobní **elastin** dodává ECM elasticitu a pevnost v tahu díky konformaci náhodného klubka a dokáže se prodloužit se o 150 % své délky. Základní jednotkou je tropoelastin, v němž převládají aminokyseliny glycin, alanin, prolin, valin, leucin a lysin. Elastinová vlákna bývají pokrytá mikrofibrilami, které jsou tvořeny různými glykoproteiny, především fibrilinem.

Dalšími důležitými složkami matrix jsou strukturální **proteoglykany a glykosaminoglykany** (GAG). Vyplňují extracelulární prostor, způsobují odolnost proti tlaku, navracejí tkáň do původního tvaru, přitahují vodu a odpuzují negativně nabitě molekuly. Váží se na kolagenní fibrily a vytváří tak síť. GAG jsou dlouhé nevětvěné polysacharidy s opakujícími se disacharidy, v nichž je vždy jedním členem uronová kyselina (D-glukuronová nebo L-iduronová kyselina) a druhým aminocukr (N-acetyl-D-glukosamin N-acetyl-D-galaktosamin, který je většinou sulfatovaný). Díky silnému negativnímu náboji přitahují sodné kationty, které atrahují vodu a vzniká tak hydratovaný gel, který má za následek turgor působící proti stlačení tkáně. Nejznámějšími představiteli jsou heparansulfát, chondroitin – 4 (nebo 6) sulfát, dermatansulfát, keratansulfát a mezi GAG unikátní, sulfát neobsahující kyselina hyaluronová, která je jako obrovský polymer schopná vázat velké množství vody.

Glykoproteiny se vážou přímo na kolagen nebo proteoglykan a ukotvují buňky k ECM pomocí vazebních domén. Fibronektin na kolagen typu I, laminin na kolagen typu IV v bazálních membránách. Fibronektin má sekvenci aminokyselin Arg-Gly-Asp označovanou zkratkou RGD, laminin je znám pro svou charakteristickou podobu molekuly – tvar kříže tvořený třemi polypeptidovými řetězci.

Většina molekul ECM vytváří signály, které jsou pomocí specifických buněčných receptorů (integriny) převáděny do nitra buňky, kde aktivují řadu proteinkináz a ovlivňují transkripci genů. Potažmo tedy proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Integriny také ovlivňují motilitu buňky. Jsou složeny z α či β řetězců, které tvoří heterodimery a spojují makromolekuly ECM přes membrány s buněčným skeletem. Doposud bylo popsáno 16 typů podjednotek α a 9 typu β , v kombinaci jich je objeveno 24 (Imai, 2000). Účastní se transmembránové signalizace díky tomu, že jejich extracelulární část dokáže rozpoznávat a navázat se na adhezivní konce makromolekul ECM (např. tzv. sekvence RGD) a následně ovlivnit intracelulární pochody. Každá složka ECM má svoje specifické intergriny sloužící k signalizaci. Integrin $\alpha 2\beta 1$ je definován jako specifický integrin pro kolagen typu I a IV (Imai, 2000), dále pak $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ a další neintegrinové receptory jako DDR-2 (discoidin domain receptor 2), které spojují, integrují a komunikují s kolagenem typu I, III (Pinzani, 1998). Nejznámějším integrinem, který se podílí na proliferaci a apoptotickém procesu je integrin $\alpha v\beta 3$ (Zhou, 2004). Pokud tedy dochází k remodelaci matrix, její degradace může napomáhat k odstranění nepotřebných buněk tím, že dojde ke ztrátě zachráných signálů způsobené právě přerušením intergrinové komunikace.

3.3.2. Extracelulární matrix v poškozených játrech

V normálních játrech je prostor mezi endotelovými buňkami, komplexem HSC a parenchymovými buňkami vyplněn fibrilární ECM kolagenu typu I a pouze jemnou matrix bazální membrány o nízké hustotě (Sato, 2003). Během poškození jater podléhá ECM remodelaci a ztrácí své původní fyziologické vlastnosti. Dochází ke kvantitativním i kvalitativním změnám (viz tabulka č. 1), intersticiální hmota o standardní hustotě je nahrazována převážně kolagenními vlákny (Friedman, 2000, Tsukada, 2006). V prvním stádiu jaterní fibrózy převládá syntéza kolagen typu III, V a fibronektinu, v pozdějším stádiu jaterní cirhózy jde o kolagenu typu I, IV, elastin, undulin a laminin (Shuppan, 1990). U pokročilé fibrózy je celkový obsah kolagenních i nekolagenních složek 3x až 10x větší. Hyaluronan se v Disseho prostoru normálně nachází pouze v malém množství, ale v poškozených játrech stoupá jeho množství až 8x. Koncentrace kyseliny hyaluronové roste také v séru a měření její hladiny se využívá jako jeden z neinvazivních markerů jaterní fibrózy. Dermatan, chondroitinsulfát a heparansulfát také stoupají (Benyon, 2000). Je zde rozdílná redistribuce množství lamininu, proteoglykanů, adhezivních glykoproteinů a glykosaminoglykanů, dále také přítomnost molekul, které se specificky vážou na ECM – růstových faktorů, cytokinů.

Na odstranění nadbytečné ECM se specializuje skupina enzymů, která se nazývá metaloproteinázy (MMP - matrix metalloproteinases), v játrech jich bylo identifikováno osm. MMP jsou enzymy schopné cíleně štěpit kolageny i nekolagenní komponenty ECM, jejich substráty jsou trojšroubovice kolagenu I a III, elastin, proteoglykanová jádra, fibronektin a laminin (Benyon, 2001).

Normální játra			Fibróza
Komponenta ECM	Množství	Umístění	Množství
Kolagen typu I	+	pouzdro	+++++++
Kolagen typu III	+	portální trakt	+++
Kolagen typu V	+	okolí velkých cév	+++
Kolagen typu VI	+	perisinusoidálně	+++
Hyaluronan	+		+++++++
Dermatan	++		+++++
Preteoglykany	+	Disseho prostor	++++
Chondroitin	+		+++

Tabulka č 1. Změny ve složení extracelulární matrix. (Převzato podle: Muddu, 2007).

Podle substrátové specifity a podobnosti doménové struktury se dělí do několika skupin na kolagenázy, želatinázy, elastázy, stromelysiny a membránové MMP (Folgueras, 2004). Jsou vytvářeny a uvolňovány podle aktuálních potřeb (on demand) a většinou jako neaktivní enzymy. Jsou produkovány nejenom HSC, ale i dalšími typy buněk v játrech. Aktivace MMP probíhá proteolytickým štěpením, buď jinou metaloproteinázou (membránový typ MMP -14), nebo plazminem. Inhibovány jsou naopak vazbou na tzv. tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP 1 – 4). Výsledná aktivita metaloproteináz je pak dána relativním poměrem jejich aktivní formy a inhibitorů TIMP.

V počátcích jaterního poškození dochází k degradaci normální subendotelové matrix, neboť musí ustoupit nové tvorbě. Podstatnou částí původní zdravé, nefibrilární matrix je kolagen typu IV, který je degradován pomocí MMP-2 (želatináza A) a MMP-9 (želatináza B). Ty také rozrušují denaturovaný kolagen. MMP-2 je produkována HSC, jejíž latentní forma je aktivovaná pomocí kolagenázy (MMP-1) a MMP-9. MMP-9 je vytvářena Kupfferovými buňkami. V tomto bodě dochází k poklesu proteinázové aktivity a tím i k posunu rovnováhy výrazně ve prospěch akumulace ECM (Špičák, 2008). V průběhu fibrotického procesu je

exprese a produkce MMP zvýšená, týká se to zejména metaloproteináz 2, 3, 9, 10, 13 a 14 (Sato, 2003). To znamená, že velká část nově syntetizované ECM je zároveň degradována, ale zároveň díky absenci MMP-1 nadprodukce převažuje a ECM, především kolagen typu I se ukládá. Stromelysin-1 (MMP-3) odbourává proteoglykany a glykoproteiny, MMP-1 štěpí kolagen typu I. Současně s produkcí MMP se však zvyšuje i exprese jejich TIMP, které jsou exprimovány v HSC a tlumí intersticiální kolagenázovou aktivitu (Murphy, 2002).

Pokud poškození přetrvává, vysoká hladina TIMP-1 zhoršuje možnost proteolýzy, kolagenní makromolekuly se stabilizují díky tvorbě příčných kovalentních vazeb (tzv. crosslinking). Je pravděpodobné, že právě období stabilizace kolagenních vláken je tím bodem, kdy se fibróza stává irreverzibilní. Ke zpevnění kolagenu dochází pomocí tkáňových transglutamináz, které jsou mimo jiné tvořeny aktivovanými HSC (Schnabel, 2004). Vyústěním jaterní fibrózy je tedy cirhóza s typickými noduly ohraničenými širokou vazivovou tkání.

Regrese jaterní fibrózy byla prokázána na zvířecích modelech (Hemman, 2007). Je provázena vysokou aktivitou zejména kolagenáz a nízkou aktivitou TIMP-1 může dojít k resopci kolagenních sept (Zhou, 2004). Nízká aktivita TIMP-1 umožňuje rychlou regeneraci hepatocytů podpořenou uvolněním růstového faktoru hepatocytů z vazby na ECM (Mohammed, 2005).

3.4. Jaterní hvězdicové buňky

Jaterní hvězdicové buňky (hepatic stellate cells, HSC, dříve lipocyty, Itovy buňky, perisinusoidové buňky, fat-storing cells) jsou primárním a nejvýznamnějším zdrojem ECM v normálních i fibrotických játrech. Jako první je v játrech popsal Karl von Kupffer, profesor anatomie v Kielu a následně v Mnichově, jako hvězdicové buňky („Sternzellen“) již v roce 1876. Domníval se, že se jedná o specializované endoteliální buňky jaterních sinusů, které fagocytují cizorodé látky. Skutečné Kupfferovy buňky objevil v roce 1898 polský patolog Tadeusz Browicz a opětovně v roce 1928 švýcarský anatom K. W. Zimmermann. Současné Kupfferovy buňky (makrofágy) nejsou identické s původními Kupfferovými „Sternzellen“. HSC znovu objevil počátkem padesátých let 20. století Ito v Japonsku, ale jednoznačné rozlišení endoteliálních buněk jaterních sinusů a Kupfferových buněk ukázal až na základě snímků z elektronového mikroskopu Eddie Wisse v roce 1970, a až Wake v roce 1971 demonstroval, že von Kupfferovy „Sternzellen“ a Itovy buňky jsou identické jednotky (Wake, 2004).

3.4.1. Funkce HSC v normálních játrech

HSC jsou lokalizovány v perisinusoidálním (Disseho) prostoru a tento typ buněk zaujímá 15 % z celkového počtu buněk v játrech. V klidovém stavu mají tyto neparenchymové buňky charakteristický hvězdicový tvar s mnohými výběžky, které jsou nezbytné k udržení architektury jaterní tkáně, migraci buněk, či regulaci krevního tlaku. Jsou v těsném kontaktu s hepatocyty, extracelulární matrix, endotelovými buňkami a ostatními hvězdicovými buňkami.

HSC v klidovém stavu primárně slouží k vycytávání (řízenému pomocí receptorů), skladování a následnému uvolňování vitamínu A, a jeho metabolitů ve formě retinyl palmitanů, rozpuštěných v tukových kapénkách v cytoplazmě buněk. Fyziologicky je v nich uloženo 80 % celkových zásob vitamínu A (Gressner, 2008). Kapénky vytvářejí prchavou zelenavou fluorescenci při osvětlení 325 nm, a jejich přítomnost se využívá k izolaci HSC buněk pomocí gradientové centrifugace od roku 1984. Pro transport do tkání je komplex hydrolyzován a pomocí retinol-vázacího proteinu (který je HSC exprimován, RBP) vylučován do plazmy, kde je ve tkáních v případě potřeby vycytáván pomocí specifických receptorů. HSC hrají klíčovou roli v kontrole homeostáze retinoidů (Senoo, 1994). Retinoidy regulují celou řadu dějů - zasahují do buněčného dělení, proliferace, morfogeneze a tumorigeneze (Blomhoff, 1990).

Klidové HSC mají nízkou proliferační aktivitu, nízký fibrogenní potenciál a žádnou kontraktilní aktivitu (Bedossa, 2003). Ovlivňují krevní tlak pomocí svých dlouhých výběžků, kterými obkružují krevní sinusoidy, a produkují vasoaktivní proteiny jako substance P, neuropeptid Y a somatostatin (Geerts, 2001). Klidové HSC také produkují hepatocyte growth factor (HGF), který stimuluje proliferaci hepatocytů a vascular endothelial growth factor (VEGF), který je nezbytný pro růst sinusoidálních, vaskulárních a endoteliálních buněk (Ishikawa, 1999). Navíc secernují molekuly ovlivňující kontraktilitu jako endotelin-1 (Shao, 1999), transforming growth factor- β (TGF- β) (De Bleser, 1997), neurotrofiny a erythropoetin. Nejvýznamnějším chemoatraktantem je monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) přitahující leukocyty a ostatní HSC (Pinzani, 2001). Všechny tyto mediátory úzce kontrolují homeostázu uvnitř sinusoid a patologické procesy v játrech. HSC mohou také parakrinně ovlivňovat sami sebe, a přejít tak do aktivovaného stavu. To například pomocí mediátoru Platelet Derived Growth Factor (PDGF), jehož mechanismus působení je literatuře nejlépe popsán. Expresí β -PDGF receptorů na povrchu HSC je brzkým znakem aktivace HSC, po které následuje fenotypová přeměna, a tohoto faktu by vědci rádi použili v antifibrotické léčbě za využití farmakologického antagonisty (Lee, 2011).

3.4.2. Funkce HSC v akutně poškozených játrech

V akutně poškozených játrech dochází k aktivaci HSC. Ta je řízena signály od sousedních buněk, ale také přestavbou okolního prostředí (Ramadori, 2002). Aktivaci lze rozdělit dle Friedmana na dvě části. V první fázi aktivace (tzv. iniciace) dochází k rychlým změnám v genové expresi a změně funkční i fenotypové, které mají za důsledek vyšší citlivost HSC k cytokinům a jiným vlivům. V další fázi (tzv. perpetuaci) se udržuje zejména aktivovaný genotyp, zahrnuje parakrinní i autokrinní stimulaci (Schéma č. 2). Je zřejmé, že se také sledují různé regulační proteiny, které ovlivňují aktivaci HSC. Sledují se exprese genů, u kterých je vysoká pravděpodobnost, že budou pozměněné aktivací HSC, a jsou to geny podílející se na remodelaci matrixu – MMP a TIMPs, a také jednotlivé složky matrixu jako kolagen I. Jedna z nedávných studií pomocí DNA mikroarray ukázala, že lze pozorovat významné změny u 800 genů (Rippe, 2004).

Iniciace

Nejdříve dojde k poškození hepatocytů, které je způsobeno různými příčinami např. hepatotoxickými látkami, metabolity, alkoholem či viry. Hepatocyty začnou uvolňovat kyslíkové radikály a fibrogenní mediátory přitahující leukocyty, které se začnou akumulovat. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) a oxidační stres jsou mocným podnětem k aktivaci HSC a syntéze kolagenu. Hepatocyty umírající nekrotizací či apoptózou a vzniklá tělíska jsou fagocytózou pohlcována okolními buňkami včetně HSC, což vede k tvorbě profibrogenních cytokinů a fibrogenézi (Canbay, 2004). Dochází také k aktivaci Kupfferových buněk, endotelových buněk a trombocytů, které produkují mnoho dalších cytokinů a růstových faktorů (Han, 2004). Hlavním mitogenem pro HSC je PDGF působící autokrinně. Počet receptorů pro PDGF v plasmatické membráně se zvyšuje. Kupfferovy buňky produkují PDGF i tumor necrosis factor- α (TNF- α), který je uvolňován v důsledku poškození hepatocytů a působení ROS radikálů. Ten indukuje infiltraci tkáně neutrofilů a má důležitou roli u všech typů jaterního poškození v aktivaci HSC a regeneraci hepatocytů, zejména ve druhé fázi poškození při apoptóze hepatocytů a aktivaci TRAIL receptoru. Zásadním cytokinem nejvíce podporující fibrogenézi je TGF- β 1. Potlačuje proliferaci hepatocytů, podporuje aktivaci HSC a syntézu nové ECM a zprostředkovává apoptózu hepatocytů (Colette, 2006). Aktivované HSC migrují směrem k poškozeným místům, ve kterých dochází k apoptóze a nekróze hepatocytů, a lokální proliferací se zvyšuje jejich počet (Iredale, 2000). Hromadící se HSC v místě poškození začínají produkovat prozánětlivé cytokiny, chemokiny a růstové faktory. Nejvíce fibrogenní a proliferativní jsou TGF- β 1 a PDGF (Friedman, 2006).

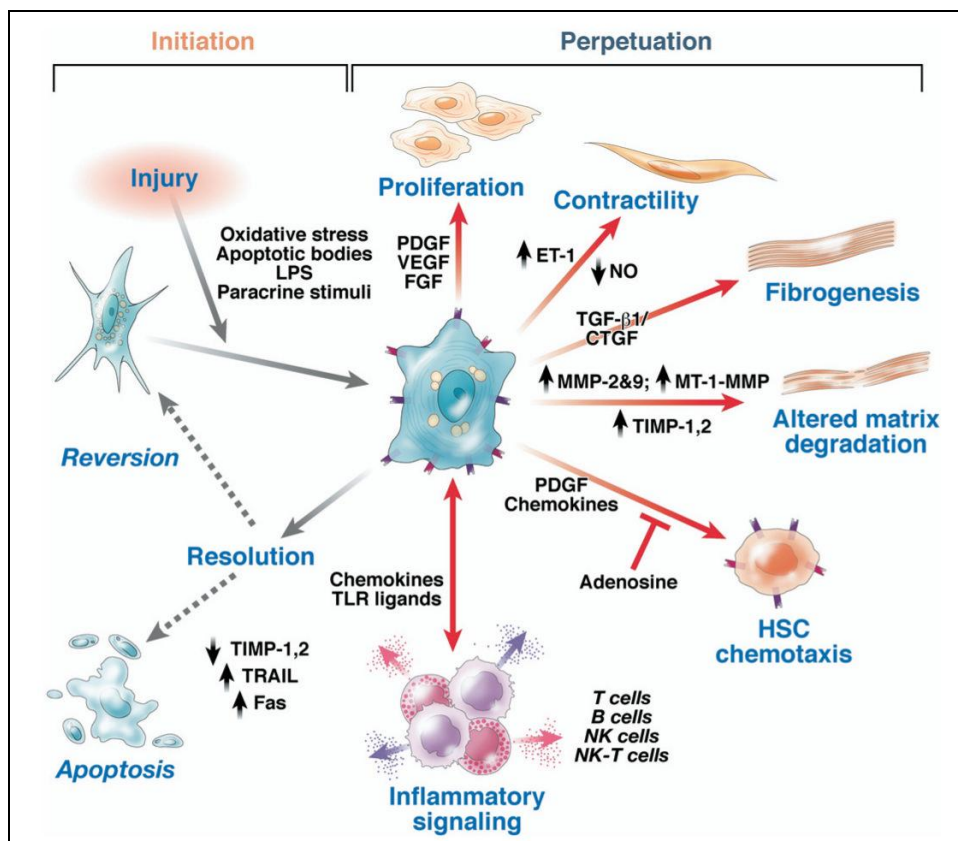


Schéma č. 2: Mechanismus aktivace HSC. Na obrázku je znázorněná iniciační fáze, kdy po poranění jater a vlivem oxidačního stresu, apoptických tělísek, lipopolysacharidů a parakrinních stimulů okolních buněk (Kupfferovy buňky, hepatocyty a endoteliální buňky) dochází k aktivaci HSC. Následuje perpetuace charakterizovaná řadou specifických fenotypových změn zahrnujících proliferaci, kontraktilitu, fibrogenezi, degradaci matrix, chemotaxi a zánětlivou signalizaci. (Převzato z Friedman, 2008).

Perpetuace

Perpetuační fázi doprovází transformace HSC, při které dochází ke ztrátě retinoidů, změně tvaru z hvězdicového typu na myofibroblastový, expresi hladkosvalového α -aktinu (α -SMA), proliferaci a novotvorbě i degradaci ECM. Proč dochází ke ztrátě tukových kapének s retinoidy, není zatím zcela jasné, retinolové receptory včetně ligandů byly nalezeny v jádrech HSC. Předpokládá se, že je jejich ztráta nutná pro iniciaci či udržení fibrogeneze, ale důkazy však zatím chybí. HSC mění svůj tvar na myofibroblastový, dochází k tvorbě aktinových a myosinových intracelulárních filament, která napomáhají migraci HSC. Tato migrace vysvětluje lokalizaci HSC podél zánětlivých sept. Zvyšuje se kontraktilita, výběžky obkružují sinusoidy a jsou schopny kontrakce díky exprimovanému α -SMA což má za následek portální hypertenzi. Z cytosinů se v kontraktilním procesu nejvíce uplatňuje endothelin-1, angiotensin II a prostaglandiny (Shao, 1999). Antagonistou endothelinu s vasodilatačním účinkem je oxid dusnatý, který má mimo jiné původ i v HSC. Na povrchu HSC dochází ke zvýšené míře

k expresi receptorů pro PDGF, což má za následek nejen migraci, ale také proliferaci (Kinnman, 2000). Expresie těchto tyrosinkinázových receptorů se liší v závislosti na aktuálním stavu buněk. Dochází k přestavbě jater, kdy je funkční parenchym během poškození narušován a nahrazován produkcí a sekrecí velké řady různých komponent ECM. Hlavním stimulem k tvorbě kolagenu I je TGF- β , jehož zdroje jsou parakrinní i autokrinní. V poškozených játrech stoupá hladina mRNA prokolagenu typu I až 60x a je regulována transkripčními faktory NF κ B a KLF (Kruppel-like faktory, které HSC exprimují hned tři). Na začátku jaterního poškození dochází k degradaci normální subendotelové matrix, která uvolní místo pro nově vytvořenou ECM. Dochází k degradaci kolagenu IV za pomoci MMP-2 (produkovanou HSC) a MMP-9 uvolňovanou Kupfferovými buňkami. Rovnováha novotvorby a odbourávání ECM je posunuta směrem ku prospěchu akumulace (Zhang, 2008). Naopak, pokud dochází k regeneraci jater, uvolňuje se TIMP z vazeb, a tudíž se aktivují další metaloproteinázy - MMP-1,-8,-13, které jsou schopné degradovat patologickou fibrilární ECM.

3.4.3. Osud HSC

Jakmile odezní akutní poškození jater, přetrvává v játrech velké množství aktivovaných HSC. Je více variant, jak se s tímto stavem organismus vyrovnává. V poškozených játrech je zvýšená nejen apoptóza, ale i mitóza HSC a záleží na tom, který proces převládne. Bylo prokázáno, že se během fáze reparace akutního poškození jater snižuje absolutní počet aktivovaných HSC a vrací na hladinu, která je běžně nalézána v normálních játrech. V experimentech in vitro byla prokázána schopnost zregulovat apoptózou vlastní počet (Benyon, 2000). Přežití aktivovaných HSC záleží na cytokinech, solubilních růstových faktorech a také na struktuře okolní matrix, které určují další osud buněk. K tomu také přispívá činnost všech dalších buněk vysílajících řadu signálů, například makrofágů, které napomáhají degradaci matrix a změně signálů. Celá řada pochodů není ještě v dnešní době dostatečně objasněna, ale současné léčebné strategie jaterní fibrózy zahrnují možnost iniciace buněčné smrti HSC (Bataller, 2005).

Jednou z nedořešených otázek je také detailní popsání jevů, ke kterým dochází při přechodu mezi dvěma základními fenotypovými podobami hvězdicových buněk. Přechod mezi klidovou a aktivovanou formou byl donedávna považován za jednosměrný, nevratný proces. V poslední době se objevují in vitro experimenty, potvrzující možnost deaktivace aktivovaných HSC a jejich návrat zpět ke klidové formě (Friedman, 2004).

3.4.4. Apoptóza HSC

Apoptóza je fyziologický proces eliminace nežádoucích buněk programovanou buněčnou smrtí buňky v protikladu k druhé formě možného zániku - nekróze. Buňky podléhající apoptóze se vyznačují řadou biochemických a morfologických změn – dochází k změnám v buněčném jádře, kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA na pravidelné dvacetipárové báze, štěpení proteinů cytoskeletu a k tvorbě charakteristických apoptotických tělísek, které jsou odstraňovány fagocytózou (Canbay, 2003). Jde o velice složitý děj s mnoha stupni regulace. S největší pravděpodobností je tento mechanismus v buňce již naprogramován a je během aktivní fáze poškození pouze „brzděn“ řadou solubilních faktorů. Signální dráhy vedoucí k apoptóze je možno rozdělit na dvě velké skupiny – vnitřní a vnější dráhu. Aktivace probíhá u obou vnějším, iniciačním signálem, kterým byla z různého důvodu buňka označena v systému jako „nepotřebná“. Tyto dráhy nejsou izolované, mohou se navzájem křížit a propojovat.

Vnější dráha má spouštěcí mechanismus v aktivaci smrtících domén tzv. death receptorů, které jsou umístěné na plazmatické membráně buněk. Ty jsou schopny vytvářet na svém povrchu HSC a po aktivaci spouští intracelulární apoptotické cesty. Jedním z těchto smrtících receptorů je TRAIL z TNF-receptorové nadrodiny, který se po aktivaci ve zvýšeném množství objevuje na povrchu HSC. Bylo prokázáno, že aktivované HSC jsou senzitivnější na vnější proapoptotickou signalizaci. Kupfferovy buňky jsou prokazatelně jedním ze zdrojů ligandu TRAIL, což znamená, že makrofágy jsou schopné ve fázi regrese fibrózy likvidovat cestou indukce apoptózy buňky odpovědné za produkci fibrilární matrix. Dalšími death receptory jsou např. Fas a NGFR (nerve growth factor receptor). Druhá, vnitřní dráha zprostředkovává většinu proapoptotických signálů vycházejících především z mitochondrií. Ta je řízena vzájemným působením členů Bcl-2 rodiny (Cory, 2002, Shimizu, 1999). Předmětem našeho zájmu je vnitřní signální dráha vedoucí k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a následné aktivaci tzv. kaspásové kaskády, která uvolní určité buněčné substráty, což vede k biochemickým a morfologickým změnám, které jsou pro apoptózu charakteristické. Dochází ke štěpení proteinů cytoskeletu a jádra (Masopust, 2003).

Proteiny náležící k rodině Bcl-2 patří ke klíčovým regulátorům buněčné smrti a mohou zajistit jak inhibici, tak iniciaci a podporu apoptózy. Lze ji rozdělit na členy s antiapoptotickou funkcí jako například protein Bcl-2, či proapoptotické, kam náleží například protein Bax. Mechanismus působení účinku ještě není přesně znám, ale základním principem je tvorba heterodimerů mezi členy Bcl-2 rodiny a následné ovlivňování mitochondriální propustnosti.

Protein Bcl-2 o velikosti 26 kDa je na membránách mitochondrií, jádra či endoplazmatického retikula. Má antiapoptotickou funkci, která je zajišťována několika mechanismy, z nichž některé ještě nejsou zcela objasněny. Je zřejmé, že ovlivňuje aktivitu iniciátorů kaspáz a kontroluje vnější mitochondriální membránu a její propustnost. Proteiny, které jsou ve zdravých buňkách bezpečně uloženy v mezimembránovém prostoru mitochondrií, jsou po apoptotickém stimulu uvolněny do cytoplazmy a tam se účastní na kaspázách závislého či nezávislého apoptotického procesu. Zatímco Bax a jemu podobné proteiny zvyšují mitochondriální propustnost, Bcl-2 tento proces blokuje přímým efektem na regulaci propustnosti mitochondriálních kanálů (VDAC = voltage-dependent anion channels). Dalším mechanismem je vytváření komplexů s proapoptotickými členy jako Bax a zabránění tak jejich oligomerizaci a translokaci do mitochondriální membrány, která má za následek změny v propustnosti různých proteinů. Je známo více isoform proteinu Bax, vyskytuje se jako membránový nebo cytosolický protein. Sám také in vivo homodimerizuje a pokud je nadměrně exprimován, urychluje apoptózu a působí proti Bcl-2. Po apoptotickém stimulu tedy určuje poměr Bcl-2 a Bax přežití či smrti buňky (Jaatela, 2004). Poměr pro- a antiapoptotických dimerů je velice důležitý k tomu, zda buňka podlehne apoptóze, nebo k ní zůstane rezistentní (Cory, 2002, Masopust, 2003).

Vlastní proces apoptózy nastává proteolýzou intracelulárních bílkovin pro buňku životně důležitých. Enzymy, které tuto proteolýzu katalyzují (nebo aktivují jiné efektorové molekuly), se nazývají kaspázy (Cytosolic Aspartate-Specific cystein Proteases = CASPASE). Kaspázy jsou členy ICE rodiny (Interleukin-1b Converting Enzyme) cysteinových proteináz, až dosud jich bylo identifikováno 14. Nalézají se v cytosolu v inaktivní formě (prokaspázy). Kaspázy 2, 8, 9 a 10 jsou označovány jako „signalizující“, protože jejich dlouhá prodoména umožňuje asociaci s receptory na povrchu buňky, jako je FAS (CD95), TNF-R1 (CD120a) a DR-3 nebo CARD doména. Aktivaci může zahájit buď inductivní signál, nebo ztráta inhibujících signálů. Kaspázy hrají klíčovou úlohu v efektorové fázi apoptózy. Hlavními cílovými molekulami jsou cytoplazmatické a jaderné proteiny jako např. keratin 18, poly-ADP-ribosa-polymeráza (PARP) a laminy. Nadměrná exprese kaspázy 3 navozuje apoptózu (Shimizu, 1999). Proteiny rodiny IAP/BIRP (Inhibitor of apoptosis proteins, baculovarial IAP repeat (BIR) containing proteins) představují hlavní endogenní inhibitory kaspáz, efektorových enzymů apoptózy. Jsou charakteristické proměnlivým obsahem motivu BIR (1-3) a patří sem například protein BIR3, survivin nebo IAP4. Jsou schopny přímou vazbou inaktivovat aktivní formy apikálních a efektorových kaspáz (kaspáz 9, 3 a 7).

Apoptóza HSC vede k redukcii v produkci kolagenu a poklesu exprese TIMP 1. Souběžně dochází k uvolňování aktivních metaloproteináz a ke zvýšené degradaci fibrilárního kolagenu, které vede k následné reverzibilitě fibrózy. Pokud tedy dochází k chronickému poškození jater, dochází zřejmě k selhání v některém místě apoptotického procesu a to vede naopak k proliferaci HSC, což má za následek progresivní tvorbu ECM a fibrotizaci tkáně (Muddu, 2006).

Speciální forma apoptózy, nazývaná jako anoikis, je důsledkem reakce buňky na nedostatečnou interakci s ECM. Nejdůležitějším faktorem při iniciaci anoikis je integriny zprostředkovaná buněčná signalizace. Byla popsána u mnoha buněčných typů jako například nádorových buněk, nově bývá tento termín používán ve spojení s HSC, přesto buňky z různých tkání aktivují anoikis různými cestami. V buňkách dochází ke změnám v adhezivních molekulách, proteinkinázách, integrinových signálních molekulách, fosfatázách či signálních molekulách regulujících apoptózu. Zásadními intergriny ovlivňující spojení s kolagenem, fibronektinem nebo lamininem jsou ty s podjednotkou – $\beta 1$. Bylo prokázáno, že ztráta intergrinů obsahujících $\beta 1$ podjednotku způsobuje odloučení HSC, které jsou poté více vnímavé k anokinis, která je podobná apoptóze způsobené Gly-Arg-Asp-Ser peptidy (Iwamoto, 1999). Anoikis proto není studována na úrovni in vitro, ale in vivo, kde je pozorována změna ECM signálů pro udržení celistvosti tkáně. Hlavním znakem, na rozdíl od apoptózy, je způsob indukce anoikis. Ta nastává při nesprávné interakci cytoskeletu s ECM. Molekuly signalizující anoikis představují zásadní cíle pro budoucí možnou terapii. Je proto velmi pravděpodobné, že výzkum anoikis se zaměří především na molekuly, které přenášejí interakce buňky s mezibuněčnou hmotou a umožňují tak přežití buněk. Navození a průběh anoikis jsou zprostředkovány různými mechanismy. Zakládají se na aktivaci kaspáz a následných molekulárních pochodech, které vedou k aktivaci endonukleáz, fragmentaci DNA a buněčné smrti. Nejdříve dochází buď k porušení mitochondrií – vnitřní cesta aktivace, nebo k spuštění receptorů smrti na povrchu buňky – vnější cesta aktivace. Opět zde velmi důležitou roli hrají proteiny Bcl-2 rodiny (Chiarugi, 2008).

3.5. Reverzibilita jaterní fibrózy a cirhózy

Dle posledních výzkumů je fibróza vratný stav a stejně tak bylo zjištěno, že i cirhóza je do určitého stupně vratná (Kisseleva, 2006). Intenzivně se proto hledají léčebné možnosti k jejímu ovlivnění. Regenerace jater a reverzibilita zahrnuje přestavbu ECM a degradaci některých složek, které je potřeba odstranit, aby mohlo dojít k návratu k normální jaterní tkáni.

Zároveň je důležitým cílem zaměření terapie na snížení počtu buněčných producentů ECM. Od hledaných preparátů s antifibrotickým účinkem se žádá, aby měly specifický účinek na jaterní tkáň, minimum nežádoucích účinků a aby byly při dlouhodobém podávání dobře tolerovány.

Antifibrotickou terapii můžeme dělit do několika skupin:

- léky potlačující základní onemocnění a striktní eliminace škodlivého agens. Tím splňují prevenci dalšího poškození (využívané k léčbě virových hepatitid – interferon alfa, lamivudin, ribavirin, adefovir-dipivoxil)
- látky potlačující zánět a imunitní odpověď (kortikosteroidy, azathioprin, anti-TNF-alfa, ursodeoxycholová kyselina)
- léky s inhibičním účinkem na aktivitu hvězdicových buněk, zejména antioxidancia (vitaminy C, E, selen, silymarin, glutathion, koenzym Q10), některé cytokiny (interferon gama nebo hepatocytární růstový faktor)
- látky podporující degradaci matrix (antagonisté TGF- β a další)
- látky stimulující apoptózu hvězdicových buněk.

Některé z těchto léků jsou již zavedeny do klinické praxe, jiné jsou ve stadiu výzkumu (Příbramská, 2007, Špičák, 2008).

V sedmdesátých letech prokázaly dvě pracovní skupiny, že navození fibrózy pomocí tetrachlormethanu je spojeno se změnou kolagenázové aktivity a že progredující fibróza je zároveň spjata nejenom se změnou v složení ECM, ale také se změnou degradace ECM. Bylo prokázáno spontánní uzdravení po intraperitoneálním podání tetrachlormethanu po dobu 4 týdnů, kde bylo možno sledovat rozvíjející se fibrózu se značnou tvorbou intravaskulárních mŕstvků s fibrilami kolagenu. Histologická kontrola ukázala, že 4 týdny po ukončení podávání dávek tetrachlormethanu došlo k úplnému navrácení k původnímu stavu (Iredale, 1998). Vymizely kolagenní fibrily. Hladina mRNA prokolagenu I a TIMP-1, -2 klesala nejrychleji v prvním týdnu po poslední dávce, což koreluje s hladinou hydroxyprolinu. V tomto intervalu byla v jaterním homogenátu také nejvíce zvýšena aktivita kolagenázy. Tato data podporují teorii, že TIMP hrají jednu z nejdůležitějších rolí při regulaci jaterní fibrózy chránící ECM před degradací kolagenásou a ostatními MMP.

Dalším důležitým zjištěním byl markantní počet aktivovaných buněk v apoptóze, které se objevují hlavně v prvních třech dnech od podání poslední dávky. Pomocí jí dochází k odstranění důležitých producentů ECM, TIMP a k převaze fibrolýzy, což bylo popsáno také u procesu hojení ran a odstranění fibrózy u mnoha dalších orgánů. Například Baker (1994)

prokázal, že pomocí apoptózy jsou odstraněny nadbytečné mesangiální buňky z glomerulu během reparace mesangiální proliferativní nefritidy, a také byla zjištěna apoptóza myofibroblastů v pozdních fázích hojení ran (Darby, 1990, Desmouliere, 1995).

Alternativní strategie také zahrnuje preventivní inhibice hepatocytů spíše než zacílení na indukci apoptózy HSC, k tomu se testuje sloučenina IDN-6556, která redukuje tvorbu apoptotických tělísek, což má za následek snížení imunitního zánětu (Canbay, 2004).

V poslední době se intenzivně pracuje na studiích zabývajících se reverzibilitou jaterní fibrózy na základě ovlivnění apoptózy HSC (Friedmann, 2000, Elsharkawy, 2005). Bylo také zjištěno, že ECM hraje důležitou roli v buněčné proliferaci a přežívání buněk. V souladu s tím bylo prokázáno, že intaktní kolagen I podporuje aktivaci HSC in vivo (Trim, 2000). Také pokusy na myších ukázaly, že degradace kolagenu je kritickým bodem pro vznik indukce apoptózy během procesu reverzibility fibrózy (Issa, 2003). Také se studuje vliv MMP a TIMP na apoptózu HSC (Zhou, 2004, Murphy, 2002).

Stimulace apoptózy

Osud HSC lze ovlivnit na mnohých úrovních, řadou intracelulárních či extracelulárních faktorů, které mají vliv jak apoptotický, tak antiapoptotický, a to může ústít k reverzibilitě jaterní fibrózy (Elsharkawy, 2005). Experimentální stimulace a urychlení apoptózy je tedy jedna z možných cest antifibrotické terapie, kterou lze jaterní fibrózu ovlivnit a způsobit tak eliminaci aktivovaných buněk (Cales 1998, Iredale, 2007). Je tedy proto nutné najít specifický znak (např. povrchový buněčný receptor, jenž by byl významně navýšen na povrchu pouze aktivovaných HSC), který bude vhodným cílem pro vysoce selektivní doručení antifibrotického léku právě HSC. Nyní probíhá celá řada studií s látkami, které jsou schopné navodit apoptózu in vitro (Wright, 2001, Li, 2001, Montiel-Duarte, 2002; Yao, 2002; Zhang, 2002, Taimr, 2003, Ji, 2006). Jednou z nich je gliotoxin (viz podkapitola 3.6.2) a 15-deoxy-delta12,14-Prostaglandin J2 (Kim, 2005). V obou případech dochází již po podání jednotlivé dávky těchto apoptózu navozujících látek ke snížení počtu buněk pomocí apoptózy a může tak dojít ke spontánnímu navrácení k původnímu předfibrotickému stavu (Oakley, 2005, Wright, 2001). Dále je to například sulfasalazin, což je inhibitor Ikappa B kinázy, který snižuje expresi prokolagenu I a TIMP-1 a podporuje apoptózu na JNK závislý mechanismus (Oakley, 2005, Habens, 2005). Neméně významnou roli má také tradiční čínská medicína, v níž má celá řada látek hepatoprotektivní vlastnosti a schopnost navodit apoptózu aktivovaných HSC (Wang, 2000, Wu, 2000, Chor, 2005, Lin, 2011).

3.6. Experimentální modely navození apoptózy HSC

Pokrok k tomu, abychom mohli plně pochopit jednotlivé mechanismy, jak buněčné tak molekulární, je v možnosti zdokonalení metod izolace lidských či potkaních HSC. Nejčastěji jsou HSC kultivované na plastových Petriho miskách, kde dochází k jejich aktivaci a fenotypové odpovědi, která je podobná jako jejich reakce na poškození in vivo. Metody izolace HSC z potkaních i lidských jater byly široce standardizovány v 80. letech 20. století, a umožnily tak rychlý rozvoj tohoto oboru (Otto, 1980). V dnešní době jsou HSC dobře prostudované díky studiím na primárních kulturách. Objevuje se ale i nový trend studia na stabilizovaných buněčných liniích, lidských i potkaních, které jsou nevyčerpatelným zdrojem velkého množství buněk vhodných ke studiu a poznávání specifických funkcí, informací o buněčné aktivaci, cytokinové signalizaci, intracelulárních cestách regulujících fibrogenézi, produkci extracelulární matrix a rozvíjení antifibrotických léčiv. Dalšími zdroji výzkumu jsou modely na potkanech, krysách a také byly připraveny kmeny transgenních myší (Wasser, 1992).

Kromě plastových misek se také používají misky potažené různými složkami EMC, nejvíce kolagenem typu I. Bylo zjištěno, že HSC lépe proliferují na miskách potažených kolagenem typu I než na nepotažených plastových miskách a že syntetizují více kolagenu (Senoo, 1994a). Kolagen IV zvyšuje esterifikaci retinolu a v menší míře produkci kolagenu. Kolagenní gel ovlivňuje HSC nejen svým složením, ale také svojí trojrozměrnou strukturou. Trojrozměrná struktura ECM ovlivňuje morfologii – buněčné výběžky jsou protáhlé anebo se naopak smršťují, dle odpovědi na aktuální situaci prostředí. Pokud je v blízkém okolí HSC kolagen typu I, HSC začnou tvořit výběžky, které adherují k fibrilám kolagenu a zároveň se prodlužují podél vlákn. Po opakované extenzi a retrakci výběžků HSC získávají svůj charakteristický vzhled s konečnými štíhlými výběžky. Tento jev lze také pozorovat při kultivaci na kolagenu III, ale nikoli na kolagenu IV, či Matrigelu (Sohara, 2002). Matrigel obsahuje základní membránové komponenty, zejména laminin, heparan sulfát a nidogen a byl na něm pozorován návrat u aktivovaných buněk do klidového stavu. Přesto chybí data, která by nevratně potvrdovala návrat buněk do klidového stavu in vivo. Lze tedy říci, že membránové komponenty navozují u HSC klidový stav, a buňky plní základní funkce, naopak intersticiální kolagenní fibrily způsobují elongaci výběžků a změnu funkce (Sato, 2003).

3.6.1. Tetrachlormethanový model

Toxické poškození jater pro navození fibrózy a studium aktivace HSC je nejčastěji způsobováno pomocí opakovaného podávání tetrachlormethanu (CCl_4). Kromě této metody se také používá podvaz žlučovodu či thioacetamid a dimethylnitrosamin, nejpoužívanějším je ale právě tetrachlormethanový model, který způsobuje postnekrotickou fibrózu a připomíná alkoholické poškození jater u člověka.

Intoxikace tetrachlormethanem vyústí v poškození hepatocytů, nekrózu, zánět a fibrózu, která se postupně rozšiřuje a za 8 - 12 týdnů dojde k rozvoji cirhózy (Constandinou, 2005). Tetrachlormethan je metabolizován v játrech cytochromem P450 (zvláště izoenzymem P450 2E1) na toxický volný radikál CCl_3 . Ten potencuje řetězovou reakci a vznik dalších volných radikálů, které přímo reagují s nenasyčenými mastnými kyselinami buněčných membrán nebo organel, nebo jinými buněčnými komponentami. Vlivem nově vytvořených volných radikálů a produktů peroxidace dochází přímo i nepřímo k poškození lipidů, nukleových kyselin a dalších molekul. Hepatotoxicity tetrachlormethanu je potencována látkami, které indukují izoenzymy cytochromu P450, např. fenobarbital. V porovnání s podáváním podkožním, intraperitoneálním nebo inhalačním je nejefektivnější intragastrické podání CCl_4 .

3.6.2. Apoptóza vyvolána pomocí toxinů

Jak již bylo výše zmíněno, testuje se nyní celá řada látek schopných navodit apoptózu in vitro. Námi vybraný **gliotoxin** (GLT) stimuluje selektivní apoptózu HSC in vivo a in vitro (Hagens, 2006). GLT je fungální toxin produkovaný houbami rodu *Trichoderma*, zejména *T. viridae* a dále houbami *Gliocladium fimiratum*, *Aspergillus fumigatus* a *Penicillium cinerascens*, má antimykotické a antibakteriální účinky. Z chemického hlediska jde o epipolythiodioxopiperazin, jehož terapeutické použití in vivo je bohužel limitované jeho toxicitou. GLT způsobuje apoptózu lidských i potkaních HSC in vivo i in vitro a také i u jiných typů buněk - makrofágů a lymfocytů (Pahl, 1996). Mechanismus, kterým GLT způsobuje apoptózu, je stále neznámý, je ale spojován s mitochondriálně dependentním typem apoptózy. Teorie je více: buď reaguje s mitochondriálním proteinem ANT (adenin nucleotid transporter, Wright, 2001), nebo blokuje thiolové skupiny v membránách, působí přes inhibici I κ B kinázy, či vytváří reaktivní kyslíkové radikály. Vždy ale dojde k rozrušení mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c do cytoplazmy, což vede k aktivaci kaspázové kaskády

(Kweon, 2003, Orr, 2004). Inaktivuje celou řadu důležitých enzymů – například alkoholdehydrogenázu, inhibuje aktivitu nukleárního faktoru B a má imunosupresivní účinek.

Cykloheximid (CHX) je produkt bakterie *Streptomyces griseus*, který zasahuje do inhibice proteinové syntézy – uplatňuje svůj vliv tím, že interferuje translokační krok posunu RNA na ribozomu a tudíž zabraňuje novotvorbě proteinů. Používá se poměrně často při in vitro výzkumech, nicméně vzhledem k významným vedlejším toxickým účinkům (teratogenní a vliv na reprodukci) nemá in vivo jako antibiotikum využití. CHX způsobuje na kaspázách závislou apoptózu v relativně vysokých hladinách 100 μ g/l. Při nižších hladinách ji působí v kombinaci TNF-alfa nebo FasL (Novo, 2006).

Cytochalasin D (CYT D) způsobuje téměř úplnou buněčnou dezorganizaci sítě mikrovláken aktinu, blokuje jeho polymeraci a elongaci. To má dopad na buněčnou morfologii, dochází k přestavbě a transformaci výběžků. U různých typů buněk dochází nakonec k apoptóze buněk buď aktivací p53 cesty, nebo cestou aktivace kaspáz (Rubtsova, 1998). Cytochalasin D způsobuje apoptózu lidských myofibroblastů, splňují všechny biochemické a morfologické rysy včetně fragmentace DNA a neovlivňuje expresi MMP-2 v lidských myofibroblastech (Preaux, 2002). Citlivost lidských a potkaních HSC k apoptóze je rozdílná (Kawada, 2006). Bylo prokázáno, že aktivované, proliferující a prozánětlivé lidské HSC jsou odolné vůči většině proapoptotických podnětů. Bylo zjištěno, že důležitou roli v přežití buňky hraje poměr Bcl-2/Bax (Novo, 2006).

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Laboratorní potkani, tetrachlormethan a perfuze jater

Projekt pokusů byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Veškeré práce se zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK. Zvířata byla chována v klimatizovaných místnostech s teplotou 22 °C a s cykly světla a tmy po 12 hodinách. Potrava byla potkanům poskytnuta ad libitum.

Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab – Praha), o hmotnosti 350 – 450 g. První skupinu tvořili zdraví samci, druhé skupině byly podávány tři dávky tetrachlormethanu pro navození jaterního poškození. Tetrachlormethan byl naředěn olivovým olejem v poměru 1 : 1 a aplikován 2x týdně intragastricky v dávce 2 ml směsi na kilogram tělesné hmotnosti potkana. Po optimalizaci byl zvolen rozestup mezi dávkami 4 dny, perfuze jater byla prováděna 24 hodin po poslední dávce tetrachlormethanu.

Perfuzie jater byla prováděna podle postupu, který je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2005). Do portální vény byla zavedena kanyla, kterou byla játra postupně perfundována Hanksovým roztokem bez vápníku, 0,2% roztokem pronasy (Roche) a 0,013% roztokem kolagenasy (Roche) v kompletním Hanksově roztoku (HBSS). Roztoky byly temperovány na 37 °C. Perfuze byla ukončena, jakmile bylo zřejmé, že struktura jater byla rozrušena.

4.2. Izolace a kultivace jaterních hvězdicových buněk

Buněčná suspenze byla 30 minut inkubována s 0,001% roztokem DNasy (Roche) a potom centrifugována s využitím gradientového media Optiprep (Axis-Shield, Oslo). Ve zkumavce byly navrstveny tři rozličné vrstvy - nejdříve buněčná suspenze obsahující 17 % Optiprep, poté vrstva 11,5 % Optiprepu v HBSS a na závěr převrstvená samotným HBSS. Během centrifugace migrují HSC ze spodní vrstvy a shromažďují se na rozhraní střední vrstvy se samotným HBSS (Graham, 2002).

Čistota izolovaných HSC byla zkontrolována pomocí autofluorescenční excitace vitamínu A v tukových kapénkách při 325 nm a barvení protilátkou proti GFAP (glial fibrillar acidic protein), který je specifický pro klidové HSC. Buňky byly kultivovány maximálně po dobu sedmi dnů v DMEM médiu (Dulbeccos modified Eagle's medium) s přidávkem 10 % hovězího fetálního séra na plastových Petriho miskách, nebo na gelu připraveném z kolagenu

typu I. Kolagen typu I byl extrahován dle upravené metody Elsdala a Barda (1972) z ocasních šlach potkanů 0,25 M kyselinou octovou při 4 °C. Poté byl dialyzován proti 0,02 M kyselině octové a naředěn na finální koncentraci 1,33 mg/ml. Po sterilizaci filtrací byly 3 díly kolagenu smíchány s 1 dílem 4x koncentrovaného DMEM, takže výsledná koncentrace kolagenu byla 0,1 %. Gel polymeroval 1 - 2 hod v Petriho miskách o ploše 8 cm² v CO₂ inkubátoru a poté byl překryt médiem s 10 % fetálního hovězího séra (FBS). Koncentrace FBS byla upravena na celkových 10 % přidavkem příslušného množství FBS do media překrývajícího gely. Následující den byla na gel napipetována suspence buněk. Pro sklizení buněk kultivovaných na plastu jsme použili trypsin. K trávení kolagenních gelů kolagenázu (Serva) rozpuštěnou v HBSS v koncentraci 1mg/ml. K určení počtu buněk byla použita tryptanová modř.

4.3. Histologické zpracování jaterní tkáně, imunocytochemie

Před enzymatickou perfuzí byla získána jaterní tkáň z levého laterálního laloku, fixována 24 hodin 4% roztokem formaldehydu a zalita do parafinových bločků. Histologické řezy byly připraveny na Neurochirurgické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Histologické řezy o tloušťce 5 µm se po odparafinování v xylenu a zavodnění ethanolovou řadou obarvily hematoxylinem – eozinem (HE), modrým trichromem a dále barvením dle Gömöriho.

Pro imunocytochemickou detekci jsme použili specifických protilátek pro α -SMA, Bcl-2 a Bax s fluorescenční detekcí antigenů. Buňky jsme fixovali v 4% paraformaldehydu 10 minut, buňky na gelech byly fixovány ledovým acetonem a následně permabilizovány pomocí 0.1% Tritonu X 100 v 0.1% citrátu sodném. Nespecifická vazebná místa byla vysycena inkubací s 10% FBS po dobu 30 min. Buňky byly inkubovány s primární protilátkou přes noc při 4 °C. Anti- α -SMA 1A4 (Sigma) byla ředěna 1:400, anti Bax a Bcl-2 (Santa Cruz) 1:100. Sekundární protilátka byla ředěna 1:2 000 a byla inkubována 1 hodinu ve tmě (cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, UK). Jako negativní kontroly bylo použito myší neimunní sérum a jádra byla obarvena pomocí DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenylyndol dihydrochlorid).

4.4. Detekce apoptózy pomocí fluorescenční mikroskopie

Pro průkaz apoptózy byly zavedeny fluorescenční metody. Pro odlišení živých a mrtvých (umírajících) buněk jsme využili kombinace fluorescenčních barviv akridinové oranže (AO, Sigma) a ethidium bromidu (EtBr, Sigma), která interkalují do nukleových kyselin. Zatímco akridinová oranž proniká do intaktních buněk (zelenožlutá barva), ethidium bromid barví pouze umírající buňky s poškozenou plazmatickou membránou (červenooranžová barva). Apoptotické buňky mají kondenzovaný chromatin a jsou rovnoměrně zbarveny. Zásobní roztoky AO (10 mg/ml PBS) a EtBr (10 mg/ml PBS) se ředí v poměru 1:100 do PBS a smíchají se v poměru 1:1. Tato směs se přidá v množství 1 μ l do 25 μ l buněčné suspenze, kápne se na podložní sklíčko a pozoruje se při kombinaci filtrů pro modré světlo na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse. K analýze bylo použito nejméně 250 buněk, byl spočítán apoptotický index vyjádřený v procentech (poměr jader s apoptotickou morfologií k celkovému počtu jader) nejméně z 250 buněk a čtyř měření, výsledky byly statisticky zpracovány.

Pro sledování morfologie a barvení jader jsme dále použili DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid, Sigma). Zásobní roztok (5mg/0,5ml destilované vody) se ředí v poměru 1:10 000 do PBS. Fixované preparáty (10 minut v 4% paraformaldehydu) se barví 5 minut, opláchnou se PBS a jádra buněk se vizualizují při kombinaci filtrů pro UV. Sledujeme jaderné změny – kondenzaci a marginaci chromatinu a fragmentaci jádra. Nezměněná jádra jsou eliptická, difuzně modře jednobarevná. Na rozdíl od toho jsou apoptotická jádra scvrklá se zvlněnými okraji a obsahují z kondenzovaný chromatin. Byl spočítán apoptotický index vyjádřený v procentech (poměr jader s apoptotickou morfologií k celkovému počtu jader) nejméně z 250 buněk a čtyř měření, výsledky byly statisticky zpracovány.

4.5. Průtoková cytometrie

Průtoková (flow) cytometrie je technika umožňující rychlé měření jednotlivých částic nebo buněk, které procházejí snímacím místem laseru. Jednou z podstatných vlastností průtokové cytometrie je skutečnost, že se provádí měření každé jednotlivé buňky nebo částice a nejde tedy o průměrné hodnoty měřené v suspenzi. Průtokový cytometr je vybaven argonovým laserem, který umožňuje analýzu mnoha buněčných parametrů na základě rozptylu světla nebo fluorescence. Rozptyl světla odpovídá velikosti a granularitě (denzitě) procházejících buněk nebo částic. Jednou z velmi hojně používaných aplikací je analýza

obsahu DNA (buněčného cyklu). Tato metoda využívá fluorescenční barvivo, jež se váže specificky a stechiometricky na DNA a jehož fluorescence po navázání na DNA zvýšená. Měření obsahu DNA v jednotlivých buňkách poskytuje statický pohled na buněčný cyklus. Pro sledování změn byly buňky analyzovány v intenzitě rozptylu světla v přímém směru (Forward scatter, který koreluje s buněčným objemem) a bočním odrazu (Side scatter, koreluje s granularitou a vznikem apoptotických tělísek) a byly porovnávány vůči kontrole na Coulter Epics XL flow cytometru s 15 mW argon-ion laserem s excitační schopností při 488 nm (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA). Pro každý vzorek bylo změřeno minimálně 10 000 buněk. Získaná data byla analyzována za použití programu Multicycle AV (Phoenix Flow system, San Diego, USA) a bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

Přibližně 5×10^5 buněk v suspenzi bylo dvakrát promyto ledovým fosfátovým pufrém (PBS), stočeno a fixováno 70% ethanolem nejméně 30 min. Po centrifugaci a odstranění ethanolu pomocí PBS jsme buňky suspendovali s citrát – fosfátovým pufrém (pH 7,8; 192 ml 0,2 M Na_2HPO_4 + 8 ml 0,1 M kys. citronové) a PBS pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA při pokojové teplotě 5 min. Pro barvení bylo použit 0,5ml Vindelův roztok, ve kterém se inkubovaly 1 hod při 37 °C, a následně byla provedena analýza na průtokovém cytometru.

4.6. Analýza DNA fragmentů gelovou elektroforézou

HSC kultivované na plastu a kolagenu byly po aplikaci toxinů sklizeny, promyty PBS a rozpuštěny v lysovacím pufru (roztok s výslednými koncentracemi 1% NP-40, 20mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH 7,5; 1% SDS; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNáza A, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteináza K, 10 mM octan amonný a 95% ethanol). Izolované apoptotické fragmenty byly separovány pomocí 1,5% agarózového gelu v 1x TAE pufru při 80V. DNA byla obarvena ethidiumbromidem (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a analyzována pod UV lampou.

4.7. Izolace RNA

Celková RNA byla izolována pomocí fenol chloroformové extrakce (Chomczynski, 1987) a za použití RNeasy mini kitu (Quiagen) podle pokynů výrobce. Čistota byla určena spektrofotometricky měřením absorbance při 280/260 nm.

4.8. Multiplexní analýza exprese apoptotických genů

Sondy (úseky DNA o délce 50 basí) pro jednotlivé geny (seznam je uveden v tabulce č. 1) byly navrženy v programu Oligo Array 2.0. Vstupní celogenomovou databázi mRNA *Rattus norvegicus* jsme získali z webových stránek The National Center for Biotechnology Information (NCBI). Metodika array analýzy vychází z postupu doporučeného výrobcem (Bioscience, Jena). Izolovaná RNA je v reakci s náhodnými primery za přítomnosti reverzní transkriptázy MuMLV (Fermentas, Vilnius, Litva) převedena na cDNA, obsahující deoxyuridintrifosfát s navázaným biotinem (Fermentas, Vilnius, Litva). cDNA následně hybridizuje se sondami pro jednotlivé geny navázanými na čipu přes noc. Po zablokování nespecifických vazebných míst kaseinem (Pierce, Rockford, USA) se na biotinové zbytky naváže konjugát streptavidinu s peroxidasou (Pierce). Jako substrát pro peroxidasu se používá barvivo True Blue (KPL, Gaihersburg, USA). Obraz nahybridizovaného čipu jsme přes čtečku (AT reader 3, Clondiag, Jena) snímali do počítače; zpracování dat proběhlo pomocí programu Iconoclast (Clondiag). Výsledky exprese genů jsme normalizovali vztažením na všechny geny v souboru (Jiang, 2004). Průměr jejich exprese jsme položili roven 1.

4.9. Vyvolání apoptózy pomocí toxinů

Vyvolání apoptózy in vitro bylo způsobeno účinkem třech toxinů - vlivem gliotoxinu (Sigma), cykloheximidu (Calbiochem Merck, Praha) a cytochalasinu D (Sigma) v různých časových intervalech a koncentracích. Byly použity HSC, které byly izolované z nepoškozených jater potkanů kultivovaných na plastových miskách či kolagenních gelech po dobu 7 dní. Každý toxin má specifický mechanismus účinku pro vyvolání apoptózy. Hladiny byly zoptimalizovány, jako finální koncentraci pro pokusy jsme použili 1,5 μM GLT po dobu 5 hodin, 50 μM CHX 14 hod a 5 $\mu\text{g/ml}$ (0,01 μM) CYT D po dobu 24 hod. Toxiny byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma), ten se proto aplikuje na buňky jako negativní kontrola – v 1% koncentraci - 5, -14 a 24 hod, což je koncentrace, která je považována za netoxickou (Zeng, 2010).

Zkratka	Gene accession number	Název genu
Apoptické proteiny		
API2	NM_021752	Inhibitor apoptózy 2
Bax	NM_017059	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	NM_016993	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-x alpha	U72350	Bcl-x alpha
BIRC3	NM_023987	Buněčný inhibitor apoptózy protein 2 (cIAP 2)
Caspase-3	NM_012922	Kaspáza 3
Caspase-8	NM_022277	Kaspáza 8
c-myc	NM_012603	Protoonkogen c-myc
IAP4	NM_019195	CD47 antigen
iNOS	NM_012611	NO syntáza 2
NOS3	NM_021838	NO syntáza 3
p21	NM_053306	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 (Pak2)
p53	NM_030989	Tumor protein p53 (Tp53)
PCNA	NM_022381	Nukleární antigen proliferujících buněk
Strukturální proteiny ECM		
Col1	NM_053356	Prokolagen typ I alfa2
Col3	XM_343563	Prokolagen typ III alfa1
Col4	XM_343607	Prokolagen typ IV alfa1
Col5	NM_134452	Prokolagen typ V alfa1
Eln	XM_341061	Elastin
Fbn1	NM_031825	Fibrilin 1
Fn1	NM_019143	Fibronektin
Matricelulární proteiny		
Beg	NM_017256	Betaglykan
Bgn	NM_017087	Biglycan
Lum	NM_031050	Lumican
Plc	XM_233606	Perlecan
Sdc1	NM_013026	Syndecan1
Sdc3	NM_053893	Syndecan3
Sdc4	NM_012649	Syndecan4
SPARC	NM_012656	Osteonektin
Spp1	NM_012881	Osteopontin
Metaloproteinázy a jejich inhibitory		
A2m	NM_012488	alfa 2 Macroglobulin
Has 1	NM_172323	Hyaluronan syntáza 1
Has 2	NM_013153	Hyaluronan syntáza 2
Hyal 1	NM_207616	Hyaluronidáza 1
Hyal 2	NM_172040	Hyaluronidáza 2
Hyal 3	NM_207599	Hyaluronidáza 3
Mmp-2	NM_031054	Metaloproteináza 2
Mmp-3	NM_133523	Metaloproteináza 3
Mmp-7	NM_012864	Metaloproteináza 7
Mmp-9	NM_031055	Metaloproteináza 9
Mmp-13	XM_343345	Metaloproteináza 13
Mmp-12	NM_053963	Metaloproteináza 12
Mmp-14	NM_031056	Metaloproteináza 14
TIMP1	NM_053819	Tkáňový inhibitor MMP1
TIMP2	NM_021989	Tkáňový inhibitor MMP2
TIMP3	NM_012886	Tkáňový inhibitor MMP3

Zkratka	Gene accession number	Název genu
Chemokiny		
CTGF	NM_022266	Růstový faktor pojivové tkáně
Edn 1	NM_012548	Endotelin 1
FGF2	NM_019305	Růstový faktor fibroblastů 2
Igf1	NM_178866	Inzulinu podobný růstový faktor 1
IL 1	NM_031512	Interleukin 1 beta
IL 4	NM_201270	Interleukin 4
IL-6	NM_012589	Interleukin 6
IL-10	NM_012854	Interleukin 10
NT3	NM_031073	Neurotrofin 3
PDGFa	NM_012801	Růstový faktor destiček alfa
PDGFb	XM_343293	Růstový faktor destiček beta
Tgfb1	NM_021578	Transformační růstový faktor beta 1
Tgfb3	NM_013174	Transformační růstový faktor beta 3
TNFa	NM_012675	Faktor nádorové nekrózy alfa
VEGF	NM_031836	Vaskulární endotelový růstový faktor
Buněčné receptory a markery HSC		
Itga5	XM_235707	Integrin alfa 5
Itga6	XM_215984	Integrin alfa 6
Itgb1	NM_017022	Integrin beta 1
Itgb3	NM_153720	Integrin beta 3
Lamr1	NM_017138	Laminin receptor
ICAM-1	NM_012967	Mezibuněčná adhezni molekula
N-CAM	NM_031521	Adhezni molekula nervových buněk
Rhamm	NM_012964	Hyaluronan mediated motility receptor
Des	NM_022531	Desmin
Fbln-2	XM_232197	Fibulin 2
P100	NM_022257	Mannose-binding protein associated serine protease-1
Reln	NM_080394	Reelin
Provozní geny		
Actb	NM_031144	Aktin beta
GAPDH	NM_017008	GADP
18S RNA	X01117	18S RNA

Tabulka č. 2. Přehled stanovovaných genů, jejich zkratky a referenční čísla dle NCBI.

4.10. Stanovení aktivity laktát dehydrogenázy

Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) v médiu se provádí k ověření, zdali buňky umírají buněčnou smrtí – apoptózou, nebo došlo k nekróze toxickým poškozením. Při nekróze dochází k úniku LDH do média v důsledku poškození buněčné membrány. Stanovení aktivity je založeno na redukci pyruvátu na laktát v přítomnosti NADH (snížení koncentrace) která se sleduje spektrofotometricky. Aktivita LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) se stanoví z úbytku absorbance při 360 nm ($\text{LDH } (\mu\text{kat.l}^{-1}) = 262 \times (\Delta A_{360 \text{ nm}})$). Použili jsme N HSC kultivované na plastu a na kolagenním gelu po dobu 7 dnů, poté jsme je vystavili účinkům toxinů (viz kapitola 4.9), buňky byly sklizeny a poté byla spektrofotometricky stanovena hladina LDH v médiu. Jako pozitivní kontrola byly použity HSC zlyzované za pomoci Tritonu-X 100, jako negativní kontrola samotné medium. Uvedené výsledky shrnují zprůměrované hodnoty ze čtyř měření, vždy bylo pro počítání použito 500 tisíc buněk.

4.11. Statistická analýza

Všechny analýzy byly prováděny nejméně ve třech provedeních. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm S.E.M. Významnost těchto výsledků byla podrobena Studentovu T testu, kdy hladina významnosti $p \leq 0.05$ je považována za statisticky významnou. Statistickou analýzu provedla RNDr. Eva Čermáková z Oddělení výpočetní techniky LFHK.

5. VÝSLEDKY

5.1. Histologie normálních a akutně poškozených jater

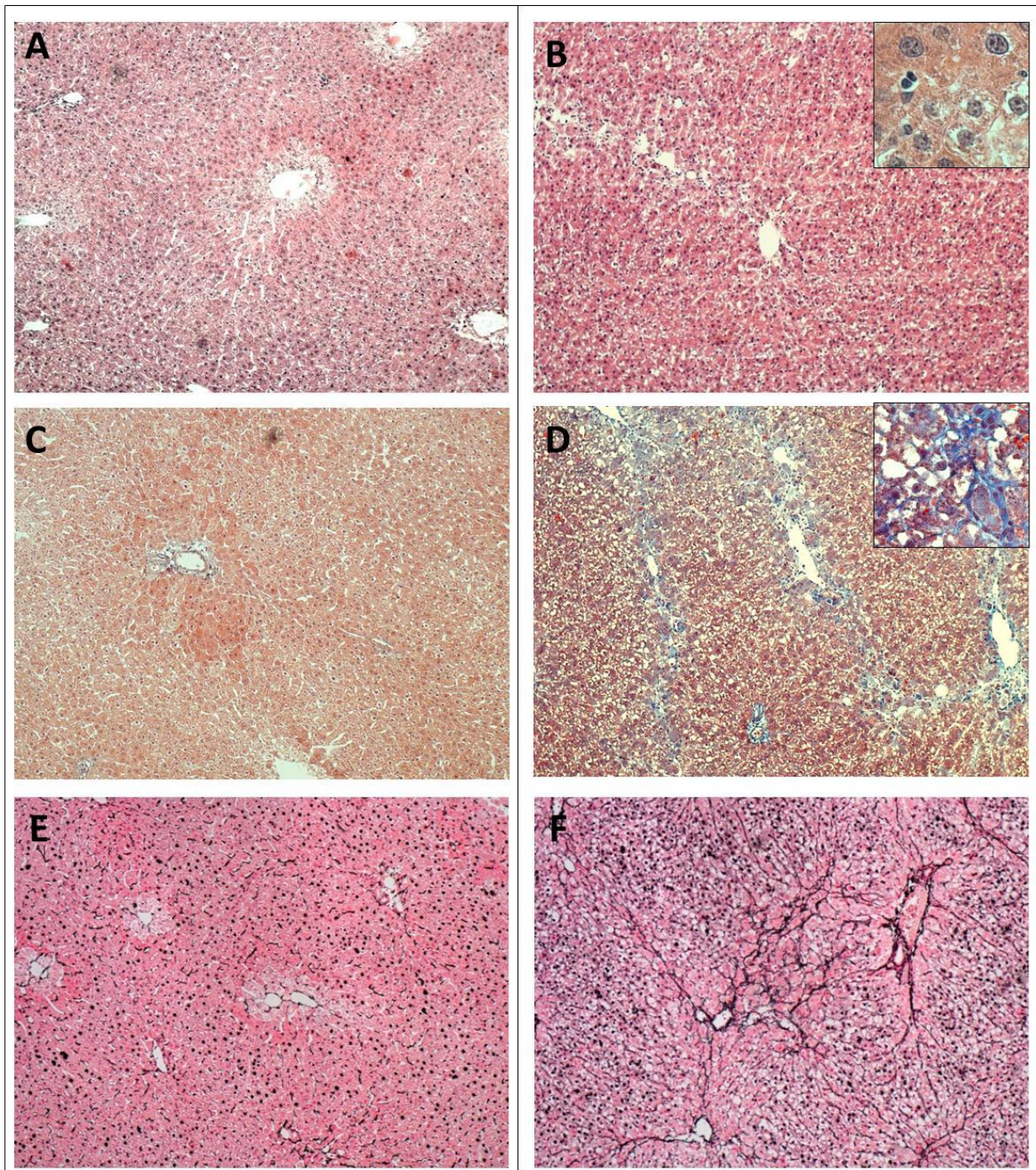
Před perfuzí jater byl odebrán do formalinu levý laterální lalok pro histologickou analýzu. Řezy jsme obarvili hematoxylinem-eozínen, modrým trichromem a Gömöriho barvením. Po obarvení HE jsou jádra hepatocytů a ostatní bazofilní substance zbarveny modře, ostatní části preparátu v různých odstínech červené a růžové. Modrý trichrom barví kolagenní vlákna a mukoidní substance modře, cytoplazma většinou červená. Barvením podle Gömöriho lze zobrazit retikulární vlákna nacházející se ve vazivových septech, která jsou černá, hnědě jsou pak obarvena vlákna kolagenní.

Na obrázku č. 1 A vidíme intaktní játra, jaterní lalůček s *vena centralis*, portobiliární prostory a sinusoidy procházející mezi hepatocyty. Jaterní parenchym je neporušený. Modrým trichromem (Obr. č. 1 C) se barví kolagenní vlákna, která se nacházejí v malém množství v okolí *v. centralis* i v jaterním parenchymu. Ve stejné lokalizaci se impregnovala i retikulární vlákna zobrazená pomocí Gömöriho barvení (Obr. č. 1 E).

Na obrázku č. 1 B, D a F jsou zdokumentována poškozená játra po třech dávkách tetrachlormethanu. Patrná je počínající přestavba jaterního parenchymu, poškozené hepatocyty umírající nekrotickou či apoptotickou (prázdné prostory v jaterním parenchymu) a je zde viditelná počínající akumulace vaziva – jak retikulárních vláken, tak kolagenu (detail ve výřezu obrázku).

5.2. Charakteristika klidových a aktivovaných hvězdicových buněk

Rozhodli jsme se zaměřit na buňky izolované z nepoškozených jater a zároveň z jater akutně poškozených pomocí tetrachlormethanu. Ty jsme získali enzymatickou perfuzí jater potkanů a opakovanou centrifugací vzniklé buněčné suspenze v hustotním gradientu. Frakce klidových a aktivovaných buněk byly vysety na plastové misky, či kolagenní gely a kultivovány až po dobu 7 dnů.



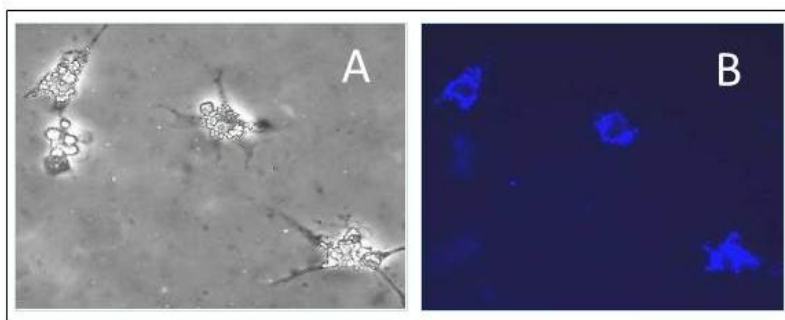
Obrázek č. 1: Histologický preparát nepoškozených potkaních jater (A, C, E) ve srovnání s toxicky poškozenými játry (B, D, F). Barvení hematoxylinem-eosinem (A, B), modrým trichromem (C, D) a Gömöriho barvením (E, F). Patrné jsou rozdíly především mezi zdravými a poškozenými hepatocyty, je viditelná počínající přestavba jaterního parenchymu, zmnožení novotvořené extracelulární matrix - modře znázorněná počínající akumulace kolagenu, černě zbarvená síť retikulárních vláken, která jsou posléze nahrazena vlákny kolagenními. Zvětšení 100x (výřez 400x).

5.2.1. Testování dávkovacích schémat CCl₄

Pro sledování apoptózy aktivovaných HSC jsme izolovali buňky z jater po akutním toxickém poškození způsobeném podáváním tetrachlormethanu. Intragastriční podávání dávek CCl₄ způsobuje vznik volných radikálů, které startují řadu dalších událostí vedoucích k fibróze jater. Pro navození apoptózy jsme zpočátku zkoušeli různá dávkovací schémata. Používali jsme 1 až 4 dávky CCl₄ a poté HSC z jater izolovali po 24 hodinách, nebo po 48 hodinách od podání poslední dávky. Z hlediska růstu buněk, vizuálního hodnocení morfologie a zároveň procenta apoptózy byl jako nejvhodnější zvolen model podání třech dávek tetrachlormethanu a jejich následná izolace 24 hod po podání poslední dávky. Tyto buňky označujeme jako C3 HSC.

5.2.2. Morfologie N HSC a C3 HSC na plastu a na kolagenním gelu

Klidové (quiescent) HSC izolované z nepoškozených jater (**N HSC**) se na plastu během šestidenní kultivace tzv. aktivují (Knittel, 1999). Po vysazení na plast i kolagen měly kulovitý tvar a obsahovaly pro ně typické lipidové částičky s vitamínem A, který je schopen emitovat záření pozorovatelné ve fluorescenčním mikroskopu (Obr. č. 2). Metoda sledování autofluorescence slouží k ověření čistoty izolované frakce neparenchymových buněk. Zjistili jsme autofluorescenci u 70 % čerstvě izolovaných neparenchymových buněk a protože je obsah tukových kapének v HSC proměnlivý, byl také použit pro ověření čistoty specifický marker pro HSC kyselý gliový fibrilární protein (GFAP). Pomocí něho byla zjištěna čistota více než 95 % (Jiroutová, 2005). Viabilita buněk byla testovaná pomocí trypanové modři s výsledkem více než 95 %. S postupujícími dny kultivace jsme pozorovali úbytek tukových kapiček, které jsou exocytózou vylučovány do svého okolí. Na plastu se buňky postupně aktivovaly, byly více rozprostřené, markantní byla vzrůstající exprese alfa aktinu hladké svaloviny (α -SMA).



Obrázek č. 2: N HSC po izolaci. A - fázový kontrast, B – autofluorescenční excitace vitamínu A měřená při 325 nm (zvětšení 200x).

Morfologie buněk kultivovaných na kolagenním gelu je pozměněná díky trojrozměrnému prostředí, které je obklopuje. N HSC byly na gelu štíhlejší, s dlouhými charakteristickými výběžky kopírujícími kolagenní fibrily. Svým tvarem více připomínaly hvězdicové buňky, které jsou nalézány in vivo. Jádra měla oválné, zpravidla bylo v buňkách jedno, viditelné byly vakuoly a v některých buňkách také tukové kapénky (Obr. č. 3 A).

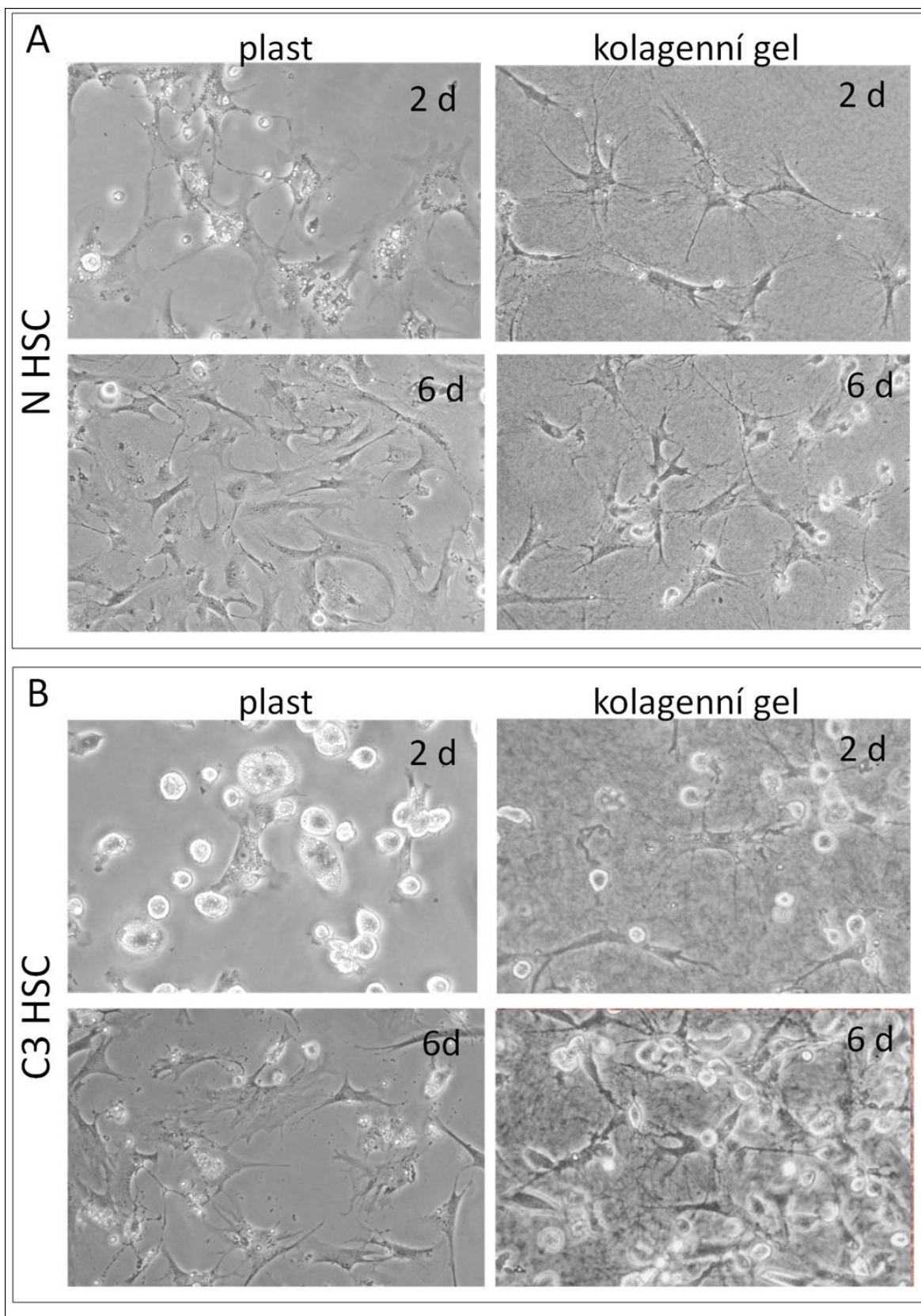
C3 HSC měly na plastu zpočátku kulovitý tvar, postupem času jich část proliferovala, a s prohlubujícím se procesem aktivace se buňky změnilly v polygonální s mnoha výběžky. Část buněk ale odumírá buněčnou programovanou smrtí – apoptózou. Při apoptóze dochází ke změně tvaru buňky, pyknóze jádra a vzniku apoptotických tělísek, která se odlučují do média.

Na kolagenu měla část C3 HSC svůj charakteristický hvězdicový tvar, který je nalézán in vivo, a část opět svítící kulovitý tvar. Buňky velmi rychle rostly a lišily se od buněk rostoucích na plastu – měly štíhlejší, protáhlá těla s četnými, dlouhými výběžky. V šestém dnu kultivace už vypadaly podobně jako na plastu (Obr. č. 3 B). Morfologicky byla viditelná apoptóza a část buněk se návrací klidového stadia.

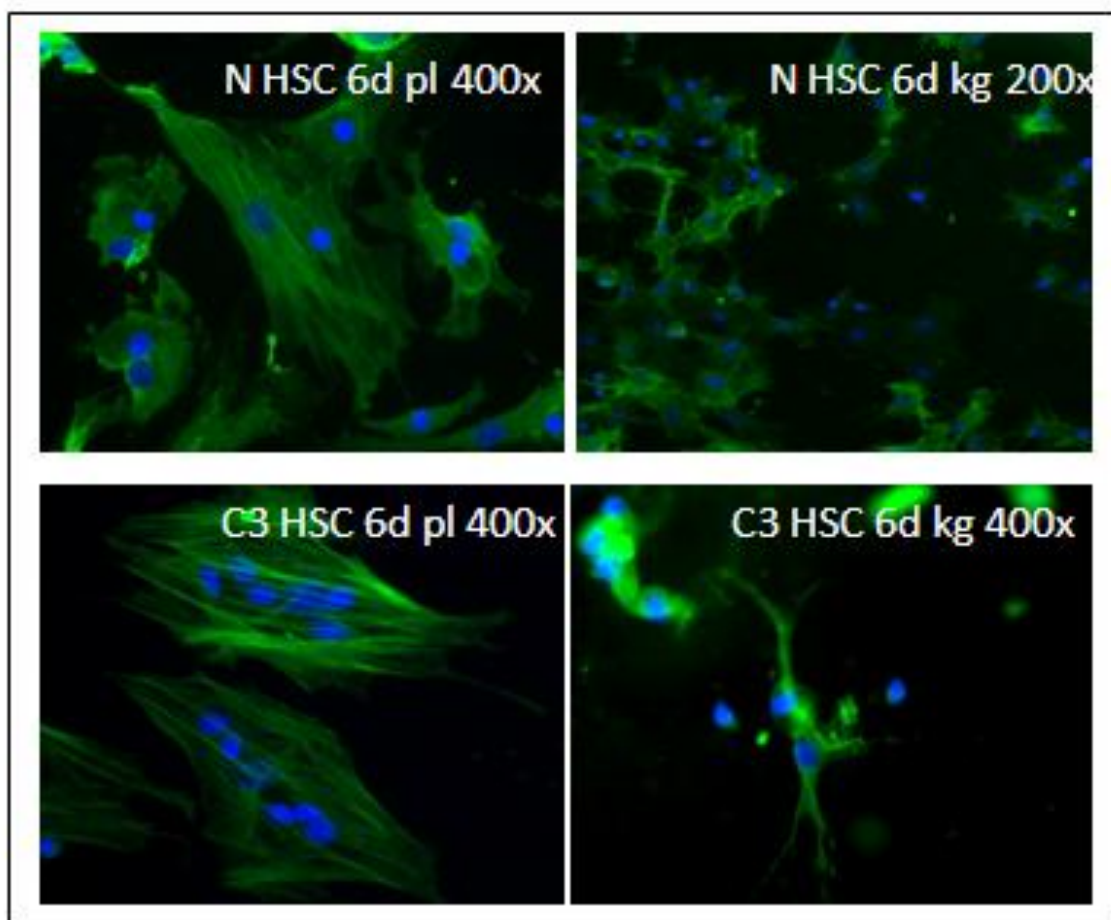
5.2.3. Imunocytochemický průkaz hladkosvalového α -aktinu

Hladkosvalový alfa-aktin (α -SMA) je typickým celulárním ukazatelem aktivace HSC. Po izolaci jsou klidové, neaktivované N HSC neschopné kontrakce, α -SMA zcela chybí (Neubauer, 1996). Po dvoudenní kultivaci na plastu byla pozitivita pro α -SMA stanovena u 14 % buněk, s prodlužující se dobou kultivace (šestý den) se procento α -SMA zvýšilo až na 98 %. Na kolagenním gelu byl sledován rychlejší průběh aktivace, druhý den bylo pozitivních 40 % buněk, zatímco šestý den bylo nalezeno pouze 76 % α -SMA pozitivních buněk (Obr. č. 4).

C3 HSC jsou buňky aktivované in vivo, a proto vykazovaly druhý den kultivace na plastu pozitivitu 94 % na kolagenu obdobně 98 %. Zatímco na plastu zůstává počet α -SMA pozitivních buněk během kultivace stále stejný, na kolagenním gelu došlo k statisticky významnému poklesu až na 63 %.



Obrázek č. 3: Morfologie N HSC (A) a C3 HSC (B). Buňky byly kultivovány na plastových miskách a na kolagenním gelu typu I po dobu 2 a 6 dní (fázový kontrast, zvětšení 200x).



Obrázek č. 4: Imunofluorescenční detekce α -SMA. Na fotografiích jsou ukázány N i C3 HSC kultivované na plastu a na kolagenním gelu v šestidenním intervalu (zvětšeno 400x, a 200x). Jsou zde zeleně zvýrazněny fibrily aktinu táhnoucí se přes celou buňku a vytvářející síť s vysokým kontraktilním potenciálem, modře jsou za pomoci DAPI zvýrazněna jádra buněk, v některých je patrná vysoká mitotická aktivita.

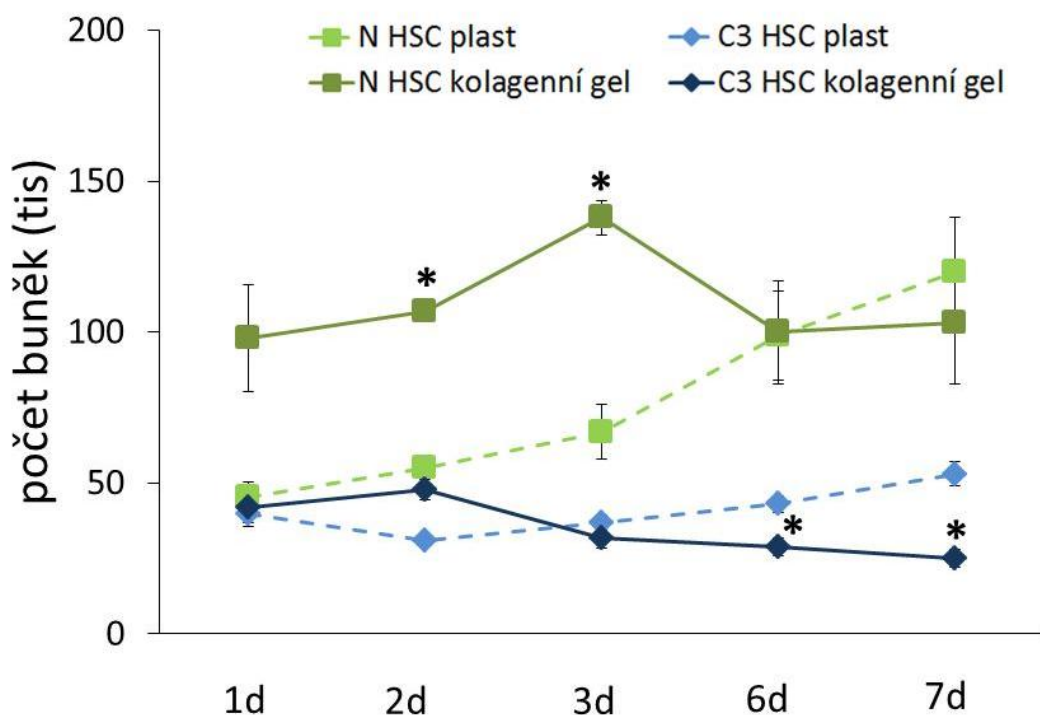
Procento α -SMA pozitivních buněk		
N HSC	Den 2	Den 6
plast	14 \pm 2	98 \pm 2
kolagenní gel	40 \pm 3*	76 \pm 5*
C3 HSC		
plast	94 \pm 5	95 \pm 2
kolagenní gel	98 \pm 1	63 \pm 5*

Porovnání počtu pozitivních N HSC a C3 HSC při dvou a šestidenní kultivaci. Buňky se na plastu postupně aktivují a hladina α -SMA vzrůstá. Všechny aktivované HSC bez rozdílu původu vykazují expresi α -SMA, kolagenní gel způsobuje pokles pozitivity po šestidenní kultivaci. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchytky průměru. Statická významnost plast vůči kolagenní gel $p \leq 0.05$ (Studentův t-test).

5.2.4. Proliferace N HSC a C3 HSC na plastu a na kolagenním gelu

Počet buněk se v průběhu kultivace mění. Měřili jsme proliferaci N HSC i C3 HSC během sedmi dnů po vysazení (Graf č. 1). Buňky byly vysázeny na oba povrchy ve stejném počátečním počtu 500 tisíc. N HSC proliferují na obou površích s rozdílnou dynamikou v čase, počet C3 HSC se během kultivace výrazně nemění.

Zpočátku je patrné, že kolagen podporuje proliferaci N HSC, buňky se rychleji množí, od třetího dne naopak dochází k jejich postupnému ubývání. N HSC na plastu po dvoudenní fázi stagnace začínají proliferovat a jejich množství se po šesti dnech vyrovná počtu buněk na kolagenním gelu. C3 HSC mají významně nižší proliferační schopnost, statisticky významný rozdíl vůči N HSC se projevuje od třetího až do sedmého dne (v grafu tuto statistickou významnost pro porovnání N HSC a C3 HSC pro přehlednost neuvádíme). Kultivace na kolagenním gelu nemá v prvních třech dnech vliv na dělení C3 HSC, nezaznamenali jsme proliferaci nebo byla balancována apoptózou, významný rozdíl v počtu buněk nacházíme až den šestý a sedmý.

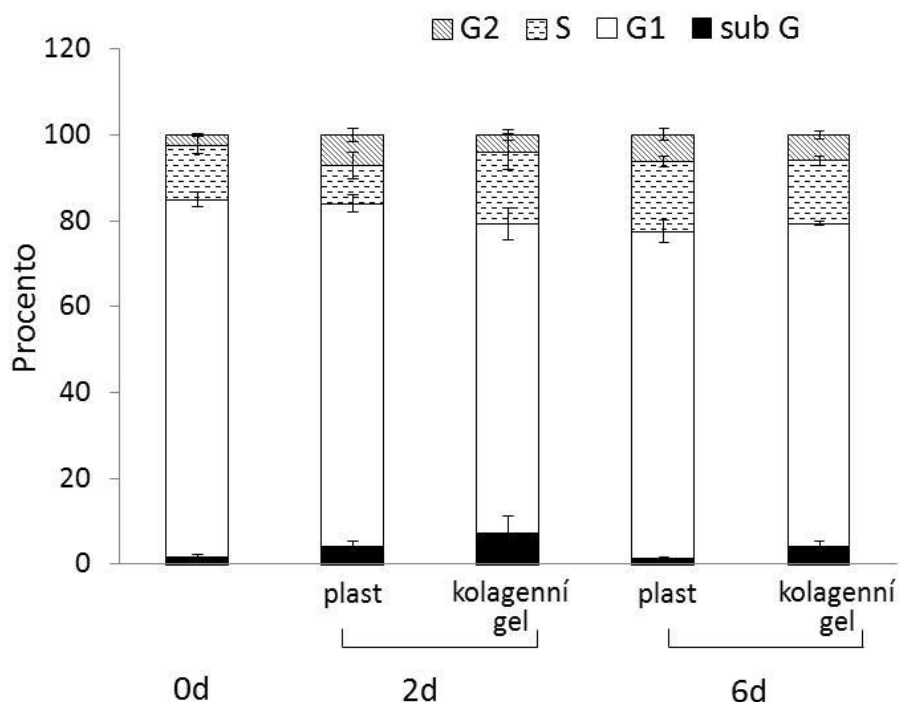


Graf č. 1: Stanovení počtu N HSC a C3 HSC vysazených na plast a kolagenní gel (počáteční množství buněk bylo 5×10^5) v průběhu sedmidenní kultivace. HSC byly sklizeny pomocí trypsinu a kolagenázy. V grafu jsou uvedeny průměry a chybové úsečky odpovídající směrodatné odchylce průměru. Statisticky významné rozdíly mezi počty buněk na plastu a na kolagenním gelu je vyznačena (*). Statistická významnost ověřena Studentovým t-testem ($p \leq 0.05$).

5.3. Analýza N HSC pomocí průtokové cytometrie

Byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie buněk izolovaných z intaktních jater kultivovaných na plastu i na kolagenním gelu v intervalech 0, 2 a 6 dní (výsledky ze čtyř měření jsou uvedeny v Grafu č. 2).

Hladina apoptózy odpovídající sub G1 fázi byla velmi nízká a nijak zvlášť se během kultivace na plastu i na kolagenním gelu neměnila, výsledky nejsou statisticky významné.



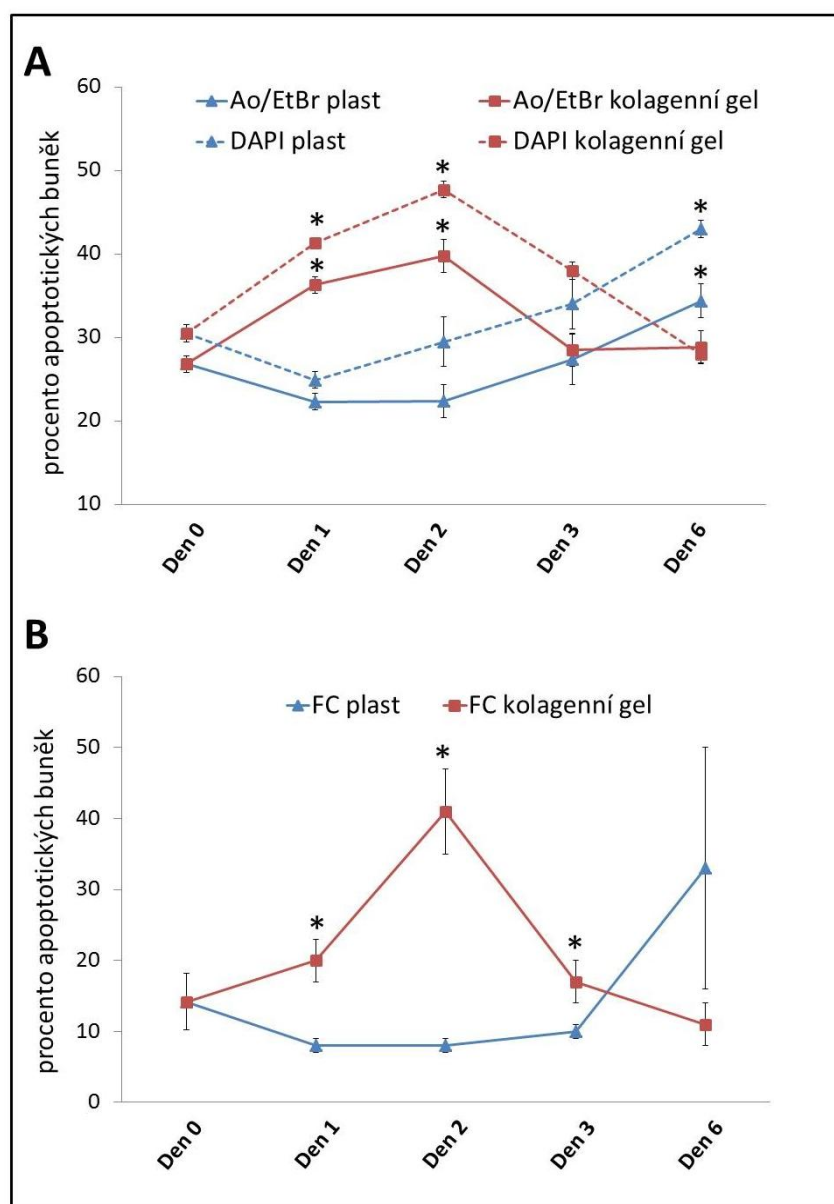
Graf č. 2. Analýza buněčného cyklu N HSC průtokovou cytometrií. Data z histogramu byla převedena do procentuálního vyjádření počtu N HSC 0, 2 a 6 dní kultivovaných na plastu a na kolagenním gelu do grafu (n=4). Nebyla prokázána statisticky významná změna (ověřeno Studentových t-testem, $p \leq 0.05$).

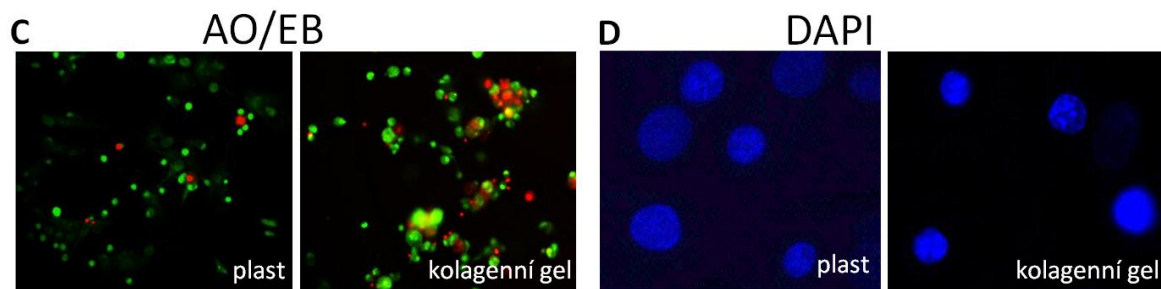
5.4. Stanovení apoptózy C3 HSC

Účelem tohoto pokusu bylo zjistit, jak ovlivňuje kolagenní prostředí apoptózu C3 HSC. K její detekci je zapotřebí použít nejméně dvou metod, aby byly výsledná data validní a proto jsme zvolili fluorescenční značení a průtokovou cytometrii.

5.4.1. Fluorescenční značení

K rozlišení žijících a apoptotických buněk C3 HSC bylo použito fluorescenční barvení pomocí AO/EtBr a DAPI. Okamžitě po izolaci bylo nalezeno 27 % buněk vykazujících apoptotické rysy barvením AO/EtBr. Nalezli jsme zvýšené procento buněk v apoptóze při kultivaci na kolagenu první a druhý den, s další kultivací (šestý den) klesla hodnota na 23 %. Na plastu jsme sledovali opačný trend, hladina apoptózy z 22 % (druhý den) postupně vzrůstala s maximem 34 % v šestém dnu kultivace. Obdobných výsledků jsme dosáhli za pomoci sledování změn jaderného chromatinu za pomoci vizualizace DAPI (Graf č. 3 A). Obě metody potvrdily, že kolagenní gel potencuje a rozvíjí apoptózu.





Graf č. 3: Stanovení procenta apoptotických buněk s použitím fluorescenčního barvení AO/EtBr a DAPI (A) a průtokové cytometrie (B). Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n=4). Statistická významnost byla potvrzena ($p \leq 0.05$). Fotografie C3 HSC barvené fluorescenčním barvením AO/EtBr na plastu a kolagenním gelu kultivované 2 dny. AO proniká do buněk a barví je zeleně, zatímco ethidium bromid proniká pouze do buněk s narušenou integritou plazmatické membrány (pozdně apoptotických či nekrotických) a barví je červeně. Zvětšení 100x. D. DAPI barvením jsou modře obarvena všechna jádra, apoptotické buňky vykazují charakteristické rysy (zmenšení jádra, kondenzaci chromatinu) ve vyšším procentu se vyskytují na kolagenním gelu. Zvětšení 400x.

5.4.2. Průtoková cytometrie

Buňky v apoptóze se pomocí průtokové cytometrie zobrazují na konečném histogramu jako sub G1 peak. Pomocí této techniky jsme potvrdili trendy apoptotických křivek získaných pomocí fluorescenčních metod. Získané výsledky mají nižší hodnotu hladiny apoptózy, ale výsledné hodnoty měly výraznější rozdíly v průběhu kultivace. Je to důsledek citlivější detekce a zároveň detekce ranějších stadií apoptózy než za pomoci fluorescenčního značení. Na kolagenním gelu je nejvyšší procento apoptotických buněk druhý den (41 %) s další kultivací klesá. Na plastu od druhého dne pozvolna vzrůstá až na 33 % ve dni šestém (Graf č. 3 B).

5.5. Analýza exprese genů u N HSC a C3 HSC

V této části experimentu jsme se zaměřili na sledování exprese genů spojených s aktivací HSC in vivo pomocí oligo arrayí. Sledovali jsme také blíže expresi dvou proti sobě působících apoptotických proteinů Bcl-2 rodiny, proteinů Bax a Bcl-2 a za pomoci imunocytochemického stanovení.

5.5.1. Multiplexní analýza exprese genů pomocí oligo cDNA čipů

Pomocí hybridizace na oligo cDNA čipy jsme sledovali expresi 94 genů souvisejících se změnami v průběhu aktivace HSC in vivo. Porovnávali jsme expresi v klidových HSC izolovaných ze zdravých jater potkanů s expresí v aktivovaných C3 HSC. Jednalo se celkem o 94 genů, které jsme pro přehlednost rozdělily do několika skupin: strukturální proteiny (7 genů), matricelulární proteiny (9 genů), chemokiny (15 genů), metaloproteinázy a jejich inhibitory (16 genů), buněčné receptory a markery HSC (12 genů) a apoptotické geny (11 genů). Výsledné hodnoty exprese genů, jejichž intenzita byla vyšší než 0,2 alespoň u jednoho z intervalů, jsou uvedeny v grafech č. 4, 5 a 6. Do grafů byla vynesena normalizovaná hodnota exprese jednotlivých genů v procentech, přičemž 100 % tvoří exprese daného genu v N HSC. Geny se zvýšenou expresí jsou v pravé části grafu, geny se sníženou expresí v levé.

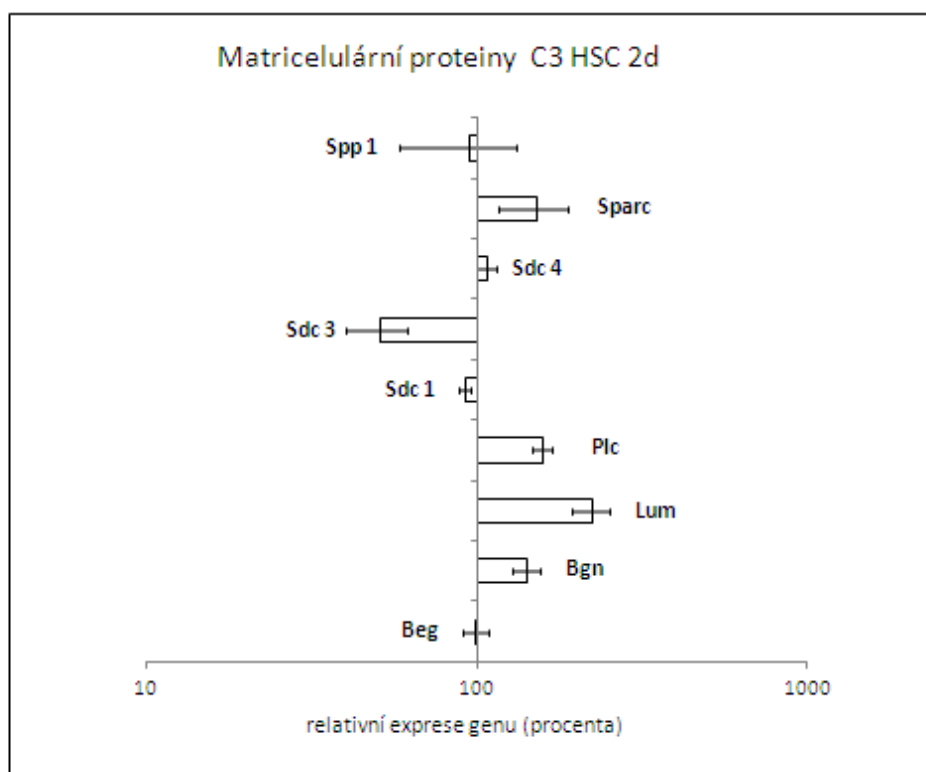
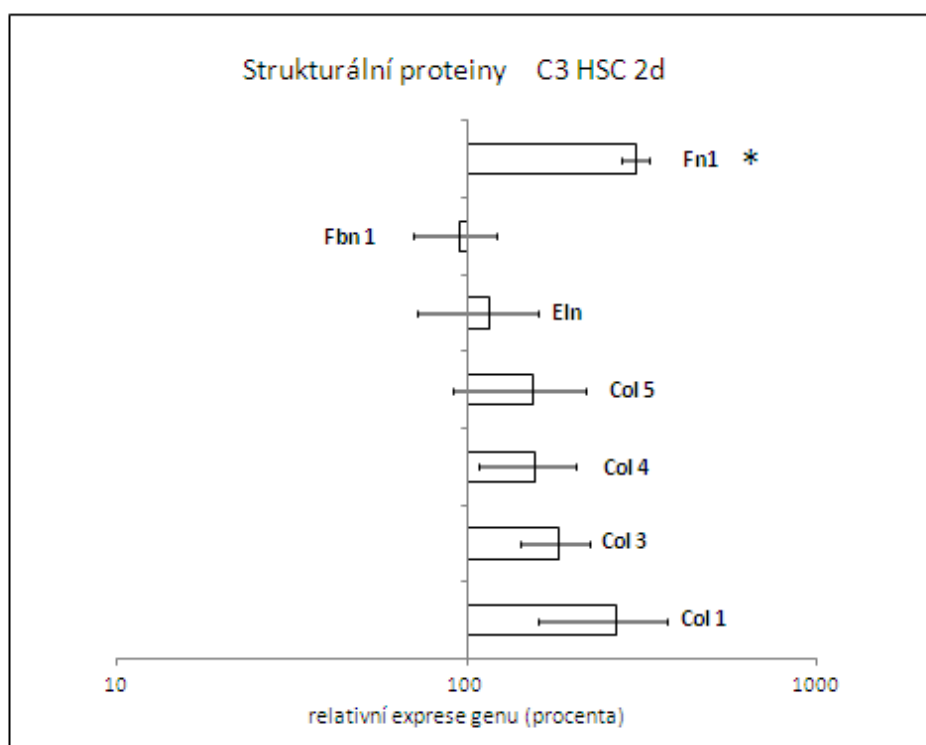
Strukturální a matricelulární proteiny

Klidové HSC izolované ze zdravých jater a C3 HSC aktivované in vivo patologickým procesem vyvolaným podáváním CCl₄ se liší nejen morfologicky, ale i expresí některých genů. Ve fázi akutního poškození se začínají exprimovat a tvořit právě tyto složky extracelulární matrix, které tak nahrazují běžnou kolagenní matrix v játrech. Dochází zejména k dramatickému nárůstu exprese fibronektinu (Fn 1) a nesignifikantnímu, leč intenzivnímu nárůstu exprese prokolagenů I, III (Col 1, Col 3). Exprese elastinu (Eln) ani fibrilinu (Fbn 1) se nezměnila. Prokázali jsme zvýšení exprese prokolagenů I, III, V (expresní poměry 5,8; 5,1; 2,0) Mezi matricelulární proteiny se zvýšenou expresí, i když nesignifikantní, můžeme zařadit perlekan (Plc) a biglykanu (Bgn) a lumikan (Lum), u syndekanu 3 (Sdc3) je tomu naopak (Graf č. 4).

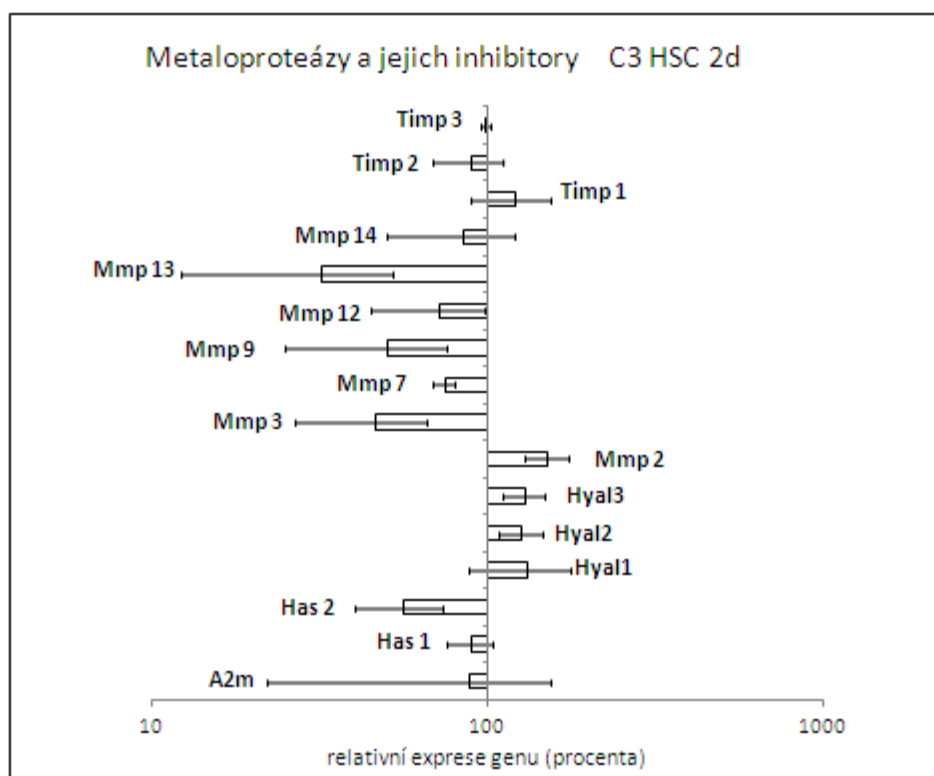
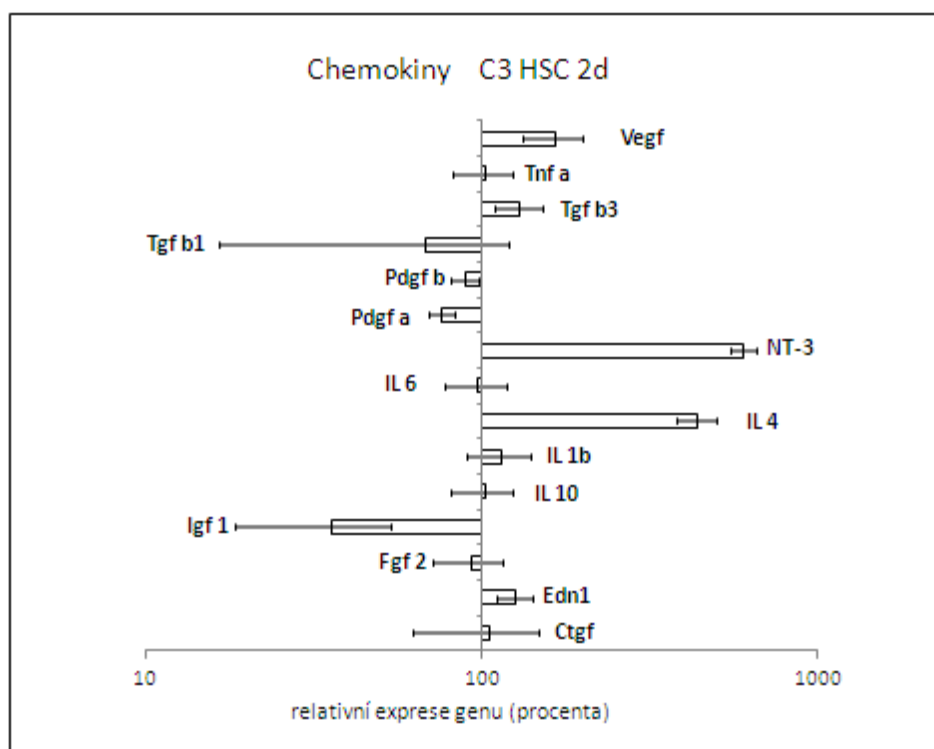
Chemokiny, metaloproteinázy a jejich inhibitory

Zvýšenou syntézu složek ECM provází během rozvoje jaterní fibrózy jejich snížená degradace pomocí MMP. Při porovnání klidových N HSC a aktivovaných C3 HSC vidíme pokles exprese MMP a to MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-13. Hodnoty mají vysokou variabilitu a nejsou statisticky významné. Exprese MMP-2 je naopak lehce zvýšená. Se sníženou aktivitou metaloproteináz souvisí nadprodukce jejich inhibitorů. Změny v expresi TIMP1, 2, 3 jsme nezaznamenali.

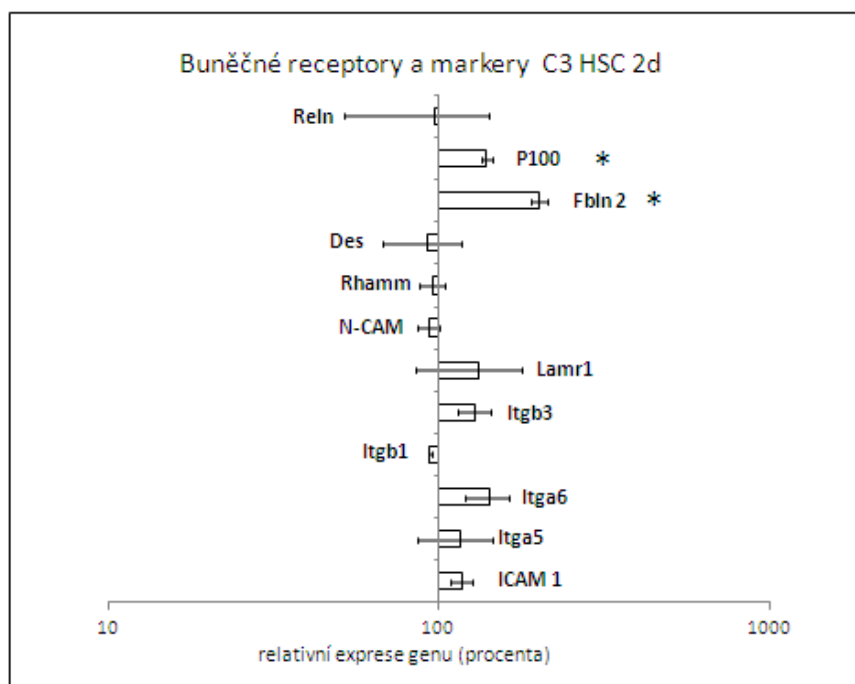
Z cytokinů a růstových faktorů se nejvýrazněji zvyšují IL-4, neurotrofin (NT-3) a VEGF (Graf č. 5).



Graf č. 4 : Stanovení exprese genů strukturálních proteinů ECM a matricelulárních proteinů. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr relativní exprese, 100 % je vždy exprese N HSC 2 dny. Vlevo od středové osy jsou geny downregulované, v pravo upregulované. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4).



Graf č. 5: Stanovení exprese genů pro chemokiny, metaloproteinázy a jejich inhibitory. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr relativní exprese, 100 % je vždy exprese N HSC 2 dny. Vlevo od středové osy jsou geny downregulované, vpravo upregulované. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4).



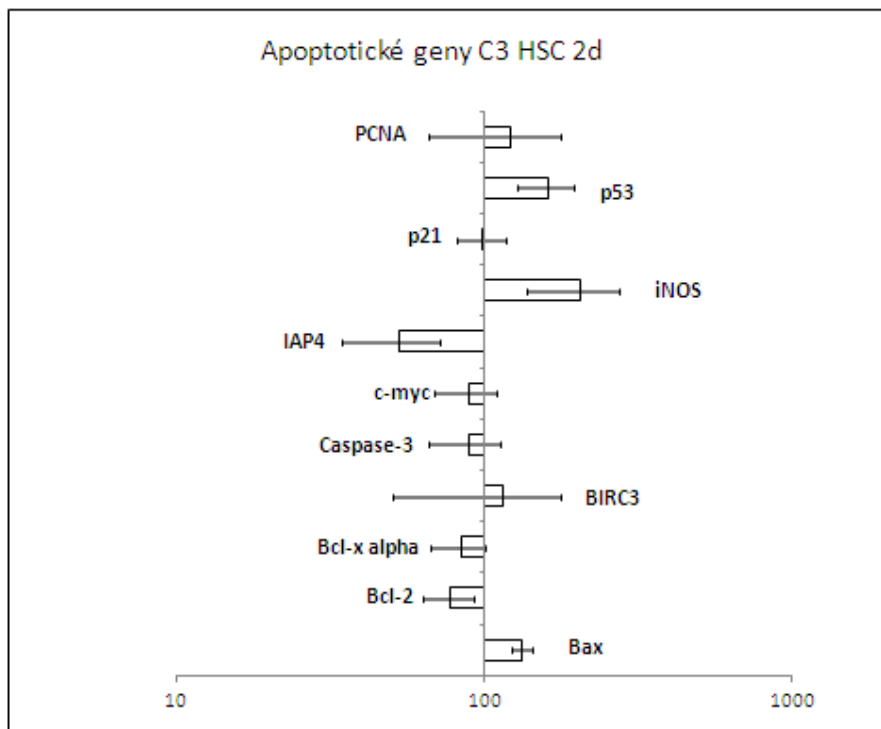
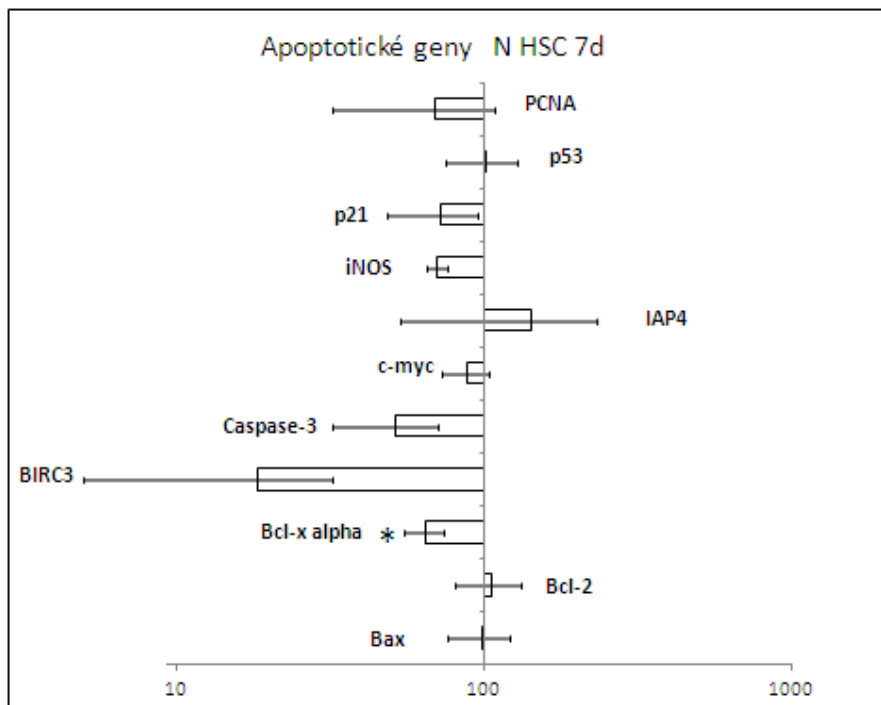
Graf č. 6: Stanovení exprese genů pro buněčné receptory a markery HSC. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr relativní exprese, 100 % je vždy exprese N HSC 2 dny. Vlevo od středové osy jsou geny downregulované, v pravo upregulované. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4).

Buněčné receptory a markery HSC

Mezi nejznámější markery aktivovaných HSC řadíme fibulin-2 (Fbln 2) a P100 (Knittel, 1999). Exprese obou signifikantně roste u C3 HSC. Exprese integrinů se nemění, integrin $\alpha 6$ a $\beta 3$ (Itga 6, Itgb 3) roste pouze nesignifikantně (Graf č. 6).

Exprese apoptotických genů

K aktivaci N HSC dochází kultivací na plastu, buňky kultivované po dobu dvou dnů jsou považovány za klidové, během sedmidenní kultivace se mění jejich morfologie (viz kapitola 5.2.2.) i exprese celé řady genů (Jiroutová, 2007). In vivo aktivované C3 HSC (toxickým poškozením jater) podléhají apoptóze, kulminující druhý den po izolaci, jak bylo prokázáno v předchozích podkapitolách 5.4.1 a 5.4.2. V grafu č. 7 jsou uvedeny relativní exprese genů aktivovaných N HSC po sedmi dnech kultivace (vztaženo na klidové N HSC kultivované 2 dny, které tvoří 100 %), významně snížený je inhibitor Bcl-x alpha. Dále uvádíme expresi genů aktivovaných C3 HSC (opět vztaženo na N HSC 2 dny).



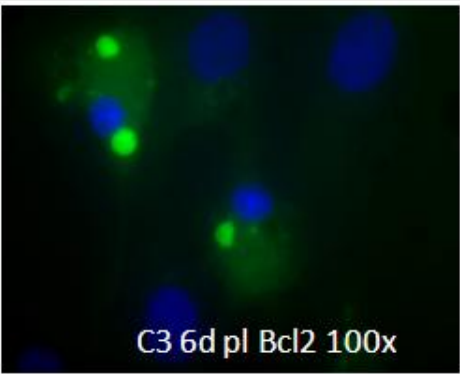
Graf č. 7 : Stanovení exprese apoptotických genů. Srovnání exprese genů na platu aktivovaných N HSC 7 dní a exprese aktivovaných C3 HSC 2 dny. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr relativní exprese, 100 % je vždy exprese N HSC 2 dny. Vlevo od středové osy jsou geny downregulované, v pravo upregulované. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4). Statistická významnost (*) ověřena Studentovým t-testem (p<0.05).

5.5.2. Průkaz apoptotických proteinů pomocí imunocytochemie

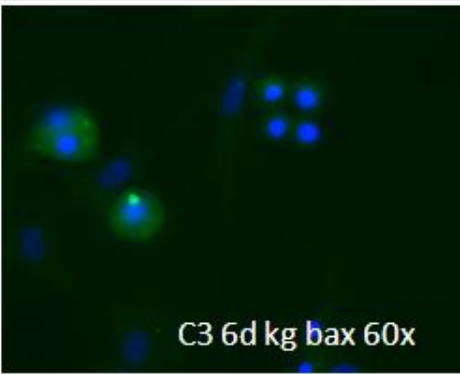
Abychom prokázali expresi apoptotických členů Bax a Bcl-2 nejen na úrovni nukleových kyselin, ale i proteinů, zvolili jsme imunocytochemickou detekci u buněk N HSC a C3 HSC v intervalu 2 a 6 dní kultivovaných na plastu a na kolagenním gelu. Zajímala nás změna apoptotického poměru Bcl-2 / Bax v průběhu aktivace buněk a v procesu apoptózy. Jako aktivované buňky považujeme N HSC 6 dní a C3 HSC, neboť vykazují skoro 100 % expresi α -SMA (viz. podkapitola 5.2.3). Na obrázku č. 5 A, B jsou uvedeny tabulky s procentem pozitivních buněk a fotografie buněk s detekovanou pozitivitou apoptotických proteinů vykazující perinukleární pozitivitu. S aktivací N HSC dochází k nárůstu antiapoptotického Bcl-2 proteinu na plastu i na kolagenním gelu, stejně tak u exprese protipůsobícího proapoptotického proteinu Bax na kolagenním gelu (Obr. č. 5 A). Apoptotický poměr Bcl-2/Bax se v procesu aktivace zvyšuje, stoupá na plastu z 0,41 na 1,02 a také na kolagenním gelu vykazuje téměř dvojnásobnou hodnotu (z 0,55 na 0,94).

U C3 HSC je u dvoudenního intervalu patrný znatelný rozdíl v expresi proteinů HSC na plastu a na kolagenním gelu. Zatímco na plastu je proapoptotický Bax exprimovaný pouze u 31 % buněk, s prodlužující se dobou kultivace jeho exprese roste na 49 %. Na kolagenu naopak klesá z 64 % na 43 %. Antiapoptotický Bcl-2 protein je na počátku na plastu exprimován u 33 % buněk a s prodlužující se kultivací roste na 53 %. Na kolagenu lze sledovat opačný trend, klesá exprese z 63 % na 34 % (Obr. č. 5 B). Poměry se vzájemně s prodlužující se kultivací nemění tak markantně jako v případě N HSC. Na plastu je změna poměru nepatrná, z 1,06 na 1,08 a na kolagenním gelu je pokles z 0,98 na 0,79. Platí, že čím je hladina apoptotického poměru Bcl-2/Bax vyšší, tím je nižší hladina spontánní apoptózy.

A			B		
Průkaz apoptotických proteinů N HSC			Průkaz apoptotických proteinů C3 HSC		
Bcl-2	Den 2	Den 6	Bcl-2	Den 2	Den 6
plast	17 ± 5	43 ± 6	plast	33 ± 2	53 ± 5
kolagenní gel	25 ± 7	66 ± 4*	kolagenní gel	63 ± 4 *	34 ± 10
Bax			Bax		
plast	41 ± 2	42 ± 2	plast	31 ± 3	49 ± 3
kolagenní gel	45 ± 4	70 ± 4*	kolagenní gel	64 ± 6*	43 ± 2



C3 6d pl Bcl2 100x



C3 6d kg bax 60x

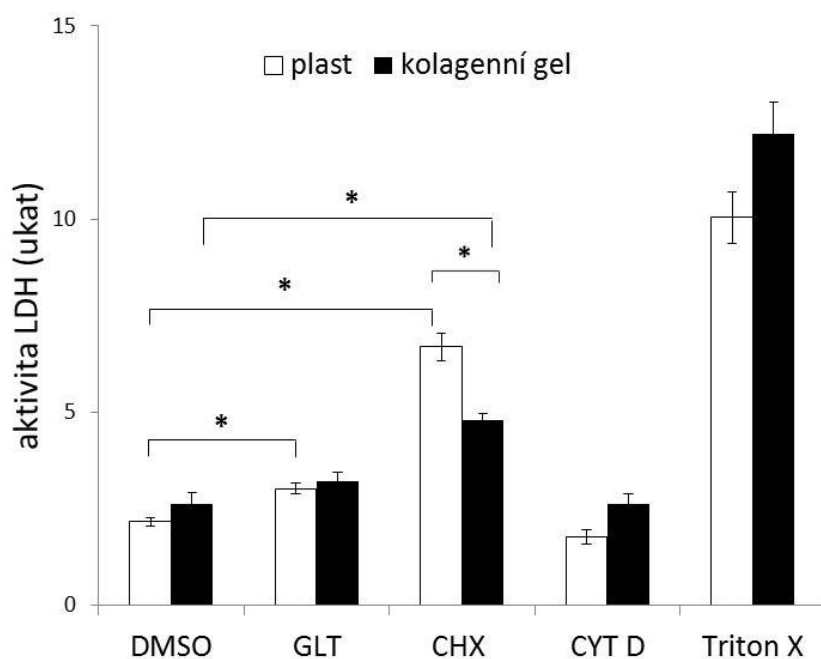
Obrázek č. 5: Imunofluorescenční detekce apoptotických proteinů Bcl-2 a Bax u N HSC (A) a C3 HSC (B) při dvou a šestidenní kultivaci. Buňky se na plastu postupně aktivují a hladina α -SMA vzrůstá a dochází ke změnám v hladinách Bcl-2 i Bax na obou površích. Statistická významnost (*) byla ověřena Studentovým t-testem ($p \leq 0.05$) ze čtyř měření. Na ilustrativních fotografiích jsou ukázány zeleně zobrazeny antiapoptický Bcl-2 protein a proapoptický Bax protein, modře jsou za pomoci DAPI zvýrazněna jádra buněk u C3 HSC kultivovaných na plastu a na kolagenním gelu v šestidenním intervalu (zvětšeno 1000 a 600x).

5.6. Vliv kolagenního gelu na apoptózu vyvolanou pomocí toxinů

Předchozí výsledky naznačují, že kolagenní gel může potencovat rozvoj dějů, které vedou k řízené apoptotické smrti HSC. Snažili jsme se toto tvrzení ověřit i na standardních modelech, používaných k navození apoptózy a to pomocí tří různých toxinů – gliotoxinu, cykloheximidu a cytochalasinu D. Působení toxinů jsme vystavili aktivované sedmidenní HSC kultivované na plastu a na kolagenních gelech. Jako kontrola bylo do média přidáno

místo toxinu rozpouštědlo DMSO v koncentraci 1 %. Každý z použitých toxinů má jiný mechanismus účinku pro vyvolání apoptózy a způsobuje ji v různých časových obdobích.

Hypotézu, že působením toxinů nedochází k nekróze buněk, ale k iniciaci apoptózy, jsme vyloučili sledováním aktivity laktátdehydrogenázy. Hladina LDH jako parametru buněčného poškození byla oproti pozitivní kontrole (totálně zničené buňky pomocí Tritonu X) srovnatelná s kontrolou (DMSO). Statisticky významné byly výsledky srovnání buněk po působení vlivu CHX vůči kontrolním buňkám, u kterých předpokládáme částečný vliv toxického účinku. Lze zde sledovat i rozdíl mezi kolagenním gelem a plastem. Ostatní výsledky vykazují nízkou hladinu poškození buněk a poměrově jsou srovnatelné s kontrolou (Graf č. 8).



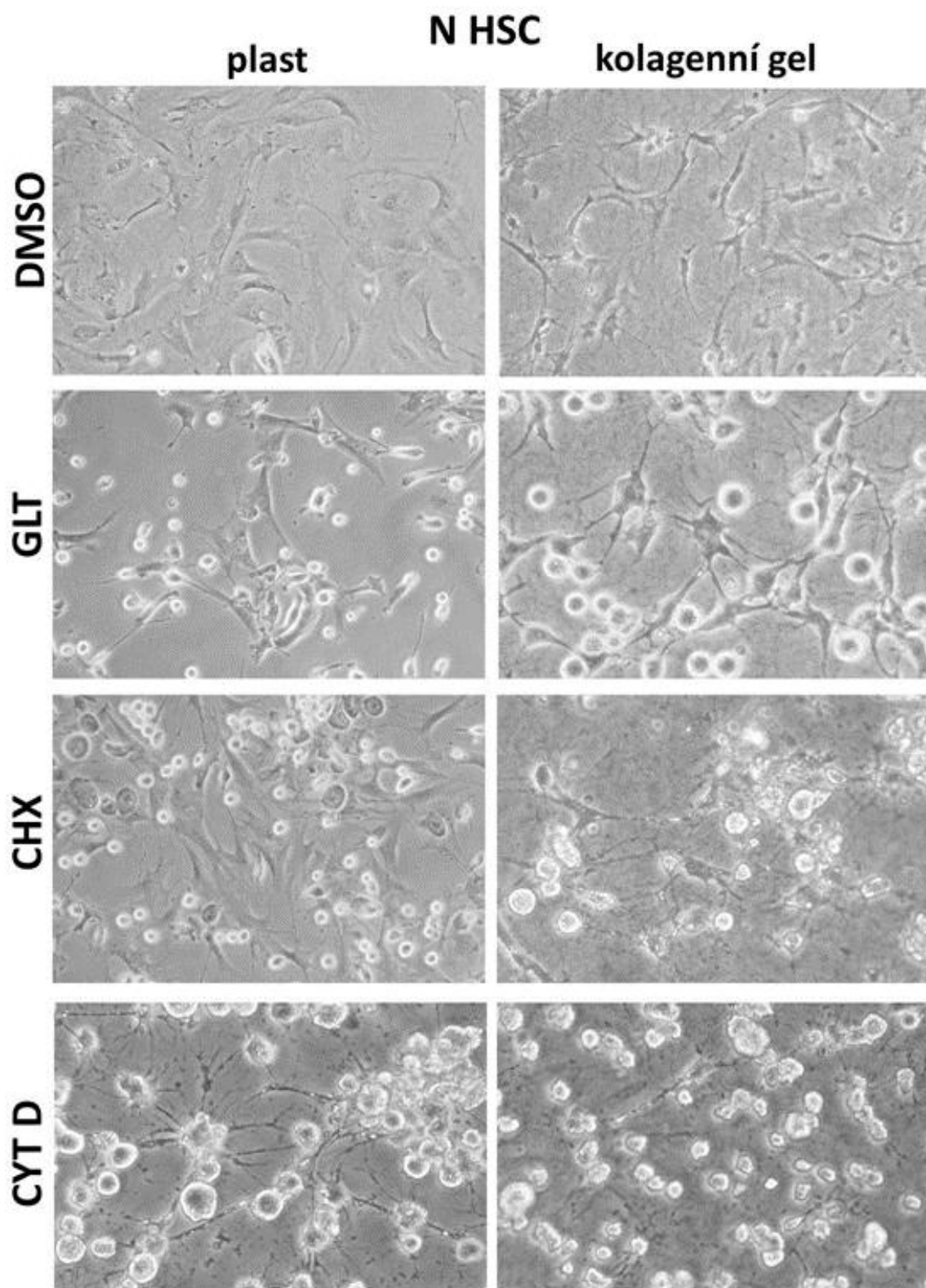
Graf č. 8: Analýza aktivity uvolněné LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) do média po působení toxinů na N HSC 7 dní na plastu i kolagenním gelu. Hodnoty jsou zobrazeny jako aktivity LDH v médiu. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru ($n = 4$). Statistická významnost (*) ověřena Studentových t-testem ($p \leq 0.05$).

Po působení toxinů došlo k významnému ovlivnění životaschopnosti HSC a morfologické změně. Došlo k postupnému vymizení výběžků, transformaci tvaru na kulovité svítící buňky, které se již velmi lehkou agitací odlučovaly do média a vykazovaly tak velmi malou adherenci jak na plastu, tak na kolagenním gelu (Obr. č. 6 A).

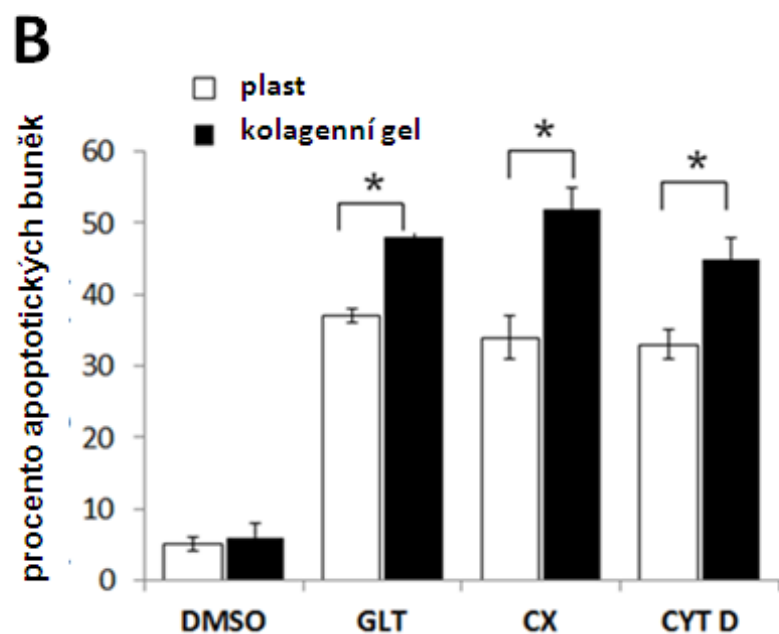
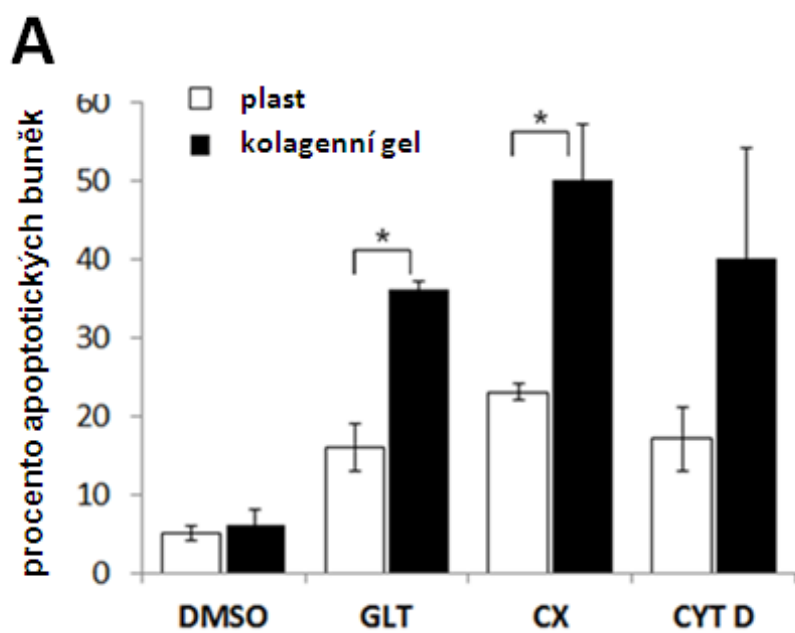
Nejmarkantnější byl tento efekt u GLT. Ten navozuje apoptózu podobnou, na kaspázách nezávislou, buněčnou smrt v koncentracích 0,4 až 3 μM po dobu kultivace 4, 6 a 8 hodin (Hagens, 2006). Optimální koncentrace zvolená pro náš pokus byla 1,5 μM po dobu 5 hod, kdy GLT způsobil masivní apoptózu HSC kultivovaných na plastu i kolagenu (Graf č.9). Způsobil kondenzaci jaderného chromatinu včetně fragmentace jaderné DNA, viditelné pomocí fluorescenčních barvení a analýzou při agarové elektroforéze (data nejsou ve výsledkové části uvedena). Kolagenní gel statisticky významně podporoval vznik a promoci apoptózy a naměřené hodnoty, ať už pomocí fluorescenčních metod nebo průtokové cytometrie, výrazně vzrostly (jednotlivá procenta jsou viditelná na grafu č. 9). Působení GLT nemělo statisticky významný efekt na distribuci buněk v různých fázích buněčného cyklu (G1, S, G2) a jejich poměr se nezměnil.

Obdobného výsledku, že kolagenní gel potencuje, podporuje a výrazně zvyšuje apoptózu HSC, jsme dosáhli i u obou dalších toxinů (Graf č. 9). CHX způsobuje na kaspázách závislou apoptózu v koncentracích od 50 do 200 μM po dobu 14 až 24 hod (Lee, 2011). Po vyzkoušení různých kombinací dle literatury jsme vybrali jako optimální 75 μM po dobu 14 hodin, při kterých došlo k výraznému útlumu životaschopnosti buněk (Obr. č. 6).

CYT D narušuje aktinová mikrofilamenta v buňkách a aktivuje tak cestu p53 vedoucí k apoptóze (Preaux, 2002). CYT D navozuje apoptózu nejpomaleji ze všech zkoušených toxinů v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ (0,01 μM) po dobu 24 hodin, morfologické změny jsou vidět již velice brzy, výběžky se zakulacují, na některých místech přetrhávají, buňky se mění v kulovité (Obr. č. 6). Pro větší přehlednost grafu je statistická významnost uvedena jen pro srovnání plastu a kolagenního gelu v rámci jednotlivých toxinů, neboť vůči DMSO jsou všechny výsledky významně statisticky zvýšené.



Obrázek č. 6 : A - Morfologie N HSC 7 dní kultivovaných v přítomnosti GLT - 1.5 μ M po dobu 5 hod, CHX - 75 μ M po dobu 14 hod, CYT D - 5 μ g/ml po dobu 24 hod na plastu a na kolagenním gelu. DMSO byl použit v 1% koncentraci jako kontrola. Zvětšení 200x.



Graf č. 9 A - Procento apoptózy stanoveno průtokovou cytometrií. B - Procento apoptózy stanoveno pomocí fluorescenčních metod. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4). *Statistická významnost ($p \leq 0.05$) nalezena u HSC na kolagenním gelu den 6.

6. DISKUSE

HSC plní v játrech celou řadu funkcí, mají nezastupitelnou roli při hospodaření s vitamínem A a při remodelaci poškozených jater. Mohou přecházet z klidového stadia do aktivované formy podobné myofibroblastům. Přejod je doprovázen řadou rozsáhlých změn, a to v morfologii, genové expresi i ve fenotypu. Tyto změny HSC jsou reakcí na impuls z okolního prostředí, nejčastěji se jedná o poškození hepatocytů, uvolnění chemokinů z vazby na ECM nebo z Kupfferových buněk. Předpokladem reverzibility jaterní fibrózy je eliminace buněk odpovědných za produkci extracelulární matrix tak, aby převážily resorptivní proteolytické procesy. S narůstajícími znalostmi o programované buněčné smrti HSC v souvislosti s regresí fibrózy se vynořují otázky o možnostech jejího ovlivnění.

Jelikož se ve většině studií zkoumají buňky izolované z nepoškozených jater a zřídka se izolují a kultivují již *in vivo* aktivované HSC z akutně poškozených jater, rozhodli jsme se zjistit, jak se mění exprese genů úzce souvisejících s metabolismem ECM během aktivace C3 HSC v játrech toxicky zasažených CCl₄. Tento způsob toxického poškození jater připomíná postnekrotickou fibrózu a je jedním z nejpoužívanějších modelů vedle podvázání žlučovodu, které vede k sekundární biliární fibróze. Nevýhodou podvázání žlučovodu je reverzibilita histologických změn po rekanalizaci žlučových vývodů a vysoká mortalita zvířat (Brenner, 2009). Aktivované HSC (C3 HSC) jsme izolovali z jater po akutním toxickém poškození, pro srovnání jsme použili buňky izolované z nepoškozených jater. Intragastriční podávání CCl₄ a jeho metabolismus způsobuje vznik volných radikálů, poškozuje hepatocyty a stimuluje proces aktivace HSC *in vivo*. Již na histologických preparátech obou typů jaterních tkání byl vidět zásadní rozdíl, u toxicky poškozených jater došlo k přestavbě jaterního parenchymu a bylo patrné vyšší množství ECM, zejména retikulárních a kolagenních vláken.

Nejprve jsme se zabývali změnami exprese genů HSC izolovaných z normálních a akutně poškozených jater. Naším cílem bylo popsat jaké změny u genů ze skupin strukturálních proteinů ECM, matricelulárních proteinů, chemokinů, metaloproteináz a jejich inhibitorů, buněčných receptorů a markerů HSC, a apoptotických genů jsou charakteristické pro časnou aktivaci C3 HSC. Výběr zastoupených genů vycházel z podrobné rešeršní práce školitele.

cDNA mikroarraye jsou používány k detekci změn velkého množství genů v rámci jedné analýzy. Nedávné studie pomocí cDNA mikroarrayí identifikovaly při srovnání klidových a aktivovaných HSC více než 2000 upregulovaných a 800 downregulovaných genů.

Přičemž aktivace HSC kultivací na plastru jen částečně kopíruje změny v genové expresi typické pro HSC aktivované in vivo podáním CCl₄ nebo podvázáním žlučovodu (De Minicis, 2007). Liu a spol. (2004) analyzoval 4 000 genů a z toho bylo 11,5 % upregulovaných a 9,3 % downregulovaných. Oba získali podobné výsledky týkajících se významných prozánětlivých genů, transkripčních faktorů, buněčných receptorů a cytoskeletálních proteinů.

Sledování exprese genů C3 HSC v našem pokusu pomocí oligo cDNA analýzy přineslo pouze omezené množství signifikantních změn. V úvahu jsme brali jen ty geny, u nichž byla intenzita signálu po normalizaci vyšší než 0,2. Při použitím počtu opakování (4x) se vlivem interindividuálních rozdílů a nižšímu dynamickému rozsahu metody obtížně dosahuje překročení kritéria významnosti statistických testů. Naopak nespornou výhodou oligo cDNA analýzy je snazší orientace ve výsledcích díky přijatelnému počtu sledovaných genů (94) a možnost obsáhnout jejich exprese individuálně bez nutnosti blokového popisu celých genových klastrů. I přes uvedené skutečnosti začleníme do diskuse i geny, jejichž změny v genové expresi nepovažujeme za prokázané, ale mohou naznačit trendy genové exprese při aktivaci HSC.

U C3 HSC jsme zaznamenali zvýšení exprese profibrogeních genů jako prokolagen typu I a III a signifikantní nárůst fibronektinu. Fibronektin se hromadí v časných fázích rozvoje fibrózy a předchází ukládání kolagenu. Odpovídá to histologickým nálezům, že již po aplikaci 3 dávek CCl₄ se rychle rozvíjí jaterní fibróza. HSC jsou ve fibrotických játrech zdrojem nejen některých strukturálních proteinů zejména kolagenu typu I a III, ale i matricelulárních proteinů. Exprese biglykanu, perlekanu a lumicanu byla u C3 HSC zvýšená. Matricelulární proteiny jsou proteoglykany bohaté na leucin (small leucine-rich proteoglycans SLRP). Ve své struktuře mají, jak název napovídá, proteinovou osu, ve které se často vyskytuje leucin. Na proteinové tělo se váží glykosaminoglykany. Jsou uloženy v těsné blízkosti buněk a jsou schopny vázat nejrůznější receptory, cytokiny a růstové faktory a strukturální proteiny ECM zejména kolageny. Ovlivňují tak zejména proliferaci, přežití, adhezi a migraci buněk, tedy klíčové procesy nejen pro rozvoj fibrózy, ale i pro šíření metastáz. SPARC (secreted protein rich in cysteine, je bílkovina typická pro hojení poškozených tkání. Perlekan je součástí bazálních membrán a betaglykan slouží i jako receptor pro cytokin TGF-β. Naproti tomu byla snížena exprese syndekanu 3, který je součástí plasmatických membrán. Biglykan pozitivně ovlivňuje fibrilogenezi kolagenu, vysoké hladiny obsahují například keloidy (Hunzelmann, 1996) a i fibrotická játra (Hogemann, 1997). Sérové hladiny biglykanu (uvolněné po štěpení molekuly pomocí MMP-9 a MMP-12) pozitivně korelují s progresí fibrózy u zvířecích modelů (Genovese, 2013). Lumikan se uplatňuje v první fázi tvorby kolagenních vláken. Deficience

lumican u knock-outovaných myší vedla ke snížené produkci kolagenu, díky snížené fibrilogenezi, zvýšeným odbouráváním pomocí MMP-13 i při zvýšeném počtu α SMA pozitivních buněk (Krishnan, 2012).

Při rozvoji fibrózy hrají důležitou roli integriny – transmembránové receptory, které interagují s fibrilami kolagenu i ostatními složkami ECM a ovlivňují tak další osud buňky (Imai, 2000). C3 HSC mají zvýšenou expresi $\alpha 6$ podjednotky integrinu, který slouží jako receptor pro laminin a $\beta 3$ podjednotky vázající vitronektin a trombospondin. V literatuře je popsána řada integrinů, které jsou exprimovány v HSC. Jedná se o heterodimery složené z řetězců α a β . Například $\alpha_1\beta_1$ je receptorem pro kolagen typu IV a laminin, $\alpha_2\beta_1$ pro kolagen I, laminin a fibronektin, a dalších jako například $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_8\beta_1$ (Carloni, 1996). Nejznámějším integrinem, který se podílí na proliferaci a apoptotickém procesu a koreluje se stupněm jaterní fibrózy je integrin $\alpha_v\beta_3$ (Zhou, 2004, Li, 2011). Vazba ligandu na integrin $\alpha_2\beta_1$ vede k indukci exprese MMP-9 v HSC kultivovaných v kolagenním gelu (Takahara, 2003).

Produkce ECM, MMP, TIMP a cytokinů je pro fibrózu typická. Důležitou roli tu hraje rovnováha mezi MMP a TIMP, její porušení předurčuje ukládání nebo lýzu ECM. Metaloproteinázy zaznamenaly téměř uniformně snížení po 3 dávkách CCl₄, vidíme pokles exprese MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-13. Naopak exprese MMP-2 je zvýšená, což může souviset s remodelací normální subendotelové matrix.

Kromě úlohy při vytváření matrix se HSC účastní regulace zánětlivých procesů během jaterního poškození. Mezi chemokiny bylo nejvýraznější zvýšení nalezeno u profibrotického interleukinu 4 a neurotrofinu 3 (NT-3), který patří do rodiny NGF. NGF je spojován s inhibicí proliferace a indukci apoptózy (Elsharkavy 2005), takže toto zvýšení je obtížné vyložit. Naopak o IGF-1 (insulin-like growth factor I), jehož exprese byla snížena, je známo, že apoptózu inhibuje. NT-3 a receptory pro neurotrofin (rNT) jsou exprimovány i mimo nervovou tkáň a to zejména při remodelaci tkáně, souvisejí s proliferací a migrací buněk. Exprese byla nalezena v HSC (Cassiman, 2001). Neurotrofiny indukují expresi α -SMA, kolagenu I a TGF- β 1 v časně aktivovaných HSC, v plně aktivovaných HSC stimulují syntézu prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α , SDF-1 a MCP-1 (Hubel, 2011). Dále jsme našli zvýšenou expresi VEGF. Po poškození hepatocytů dochází k významné produkci chemokinů jako TNF, TGF, IL-6 a IL-10, které mají autokrinní vliv na aktivaci HSC (Rodelfeld, 2006). Destičky produkují PDGF. PDGF-receptor patří do skupiny tzv. tyrosinkináz, které jsou významné při přenosu signálů mnoha cytokinů do HSC (např. VEGF, HGF – hepatocyte growth factor, EGF – epidermal growth factor, FGF – fibroblast growth factor). Intracelulární cesty po aktivaci PDGF receptoru zahrnují ERK/MAP kinázu, PI-3-kinázu a STAT-1 (signal

transducers and activators of transcription). PDGF ligand je nejsilnější mitogen hvězdnicových buněk, mezi další mitogeny patří endotelin-1, FGF, IGF a jiné (Pinzani, 2002). Předpokládá se, že v iniciální fázi aktivace mají důležitou roli transkripční faktory jako NFκB nebo PPAR α , kterými je exprese dalších genů díky jejich interakci se specifickými nukleotidovými sekvencemi řízena. NFκB podporuje přežití aktivovaných HSC a jejich proliferaci a působí ochranně proti TNF α indukované apoptóze HSC (Liu, 2004).

Mezi sledovanými geny byly i markery aktivace HSC a rozvoje fibrózy – Fbln 2 a P100 (Knittel, 1999), u C3 HSC jsme zaznamenali jejich zvýšení.

Další skupinou sledovaných genů byly apoptické geny. Jednalo se například o protein p53 či p21, které hrají důležitou kontrolní roli v buněčném cyklu a potažmo i apoptotickém procesu, endogenní inhibitory kaspáz IAP či BIRC3 a iNOS (nitric oxide synthase). Ta byla rovněž významně zvýšená a je zapojená do dějů doprovázených působením TNF α a umožňuje tvorbu NO* radikálů (Binder, 1999). Kultivace a transdiferenciace N HSC na plastru po dobu 7 dnů vedla k poklesu inhibitorů apoptózy BIRC3 a Bcl-x. Předmětem našeho zájmu byla exprese dvou nejvýznamnějších členů apoptotické rodiny Bcl-2, antiapoptotického Bcl-2 a proapoptotického Bax. Následně jsme jejich expresi sledovali i na proteinové úrovni.

Zjistili jsme, že aktivace buněk *in vivo* (C3 HSC) je doprovázena významným zvýšením exprese Bax, zatímco během aktivace N HSC na plastru ke změně exprese nedochází. Bcl-2 a Bax jsou protichůdně působící proteiny, které spolu heterodimerizují, a tím určují další osud buňky (Antonsson, 2003). Čím je vyšší hladina antiapoptotický proteinů, tedy čím vyšší apoptotický poměr Bcl-2/Bax, tím je nižší hladina spontánní apoptózy. Apoptózu regulující proteiny nejsou detekovatelné v nepoškozených játrech, ale po poškození nejdříve stoupá hladina exprese Bcl-2 a poté se zpožděním i proteinu Bax (Lee, 2003).

Složky ECM zásadně ovlivňují buněčnou morfologii, funkci, proliferaci a přežívání všech přítomných buněk v játrech. Jednotlivé zastoupení složek či změna fyzikálních vlastností ECM má vliv na chování buněk (Wells, 2005), stejně jeho degradace pomocí metaloproteináz (Zhou, 2004). Kolagen typu I je ve fibrotických i cirhotických játrech hojně zastoupen a proto se také využívá při kultivaci HSC - misky se jím buď potahují, nebo se buňky kultivují v trojrozměrném kolagenním gelu (Senoo, 1996). Doposud nebyla zkoumána apoptóza HSC kultivovaných v gelu připraveném z kolagenu typu I. Rozhodli jsme se zaměřit na vliv kolagenního gelu na apoptózu aktivovaných HSC.

C3 HSC jsme izolovali z jater potkanů po podání CCl $_4$ a pro srovnání jsme použili buňky izolované z nepoškozených jater N HSC. Měřili jsme proliferaci, expresi α -SMA a apoptózu obou buněčných typů jak na plastru, tak na kolagenním gelu.

HSC izolované z nepoškozených jater byly v klidovém stavu (Jiroutová, 2005). Ke spontánní aktivaci klidových HSC z neovlivněných jater došlo až kultivací na plastových miskách po několika dnech, což je v souladu s literaturou (Knittel, 1999). Tento způsob je běžně využíván pro studium HSC. Aktivace HSC se projevuje celou řadou změn tvaru, funkce, ztrátou lipidových kapének, proliferací a také expresí α -SMA. Ten v průběhu kultivace vzrůstá a po sedmi dnech vykazuje na plastu skoro stoprocentní expresi, stejně tak se pozitivita vyskytuje se stejnou frekvencí u C3 HSC kultivovaných dva dny. Překvapivě byla u těchto buněk po šestidenní kultivaci nalezena významně snížená hladina α -SMA, na kolagenním gelu jich nevykazovalo α -SMA pozitivitu až 40 %, což odpovídá tezi o návratu aktivovaných HSC zpět do klidového stavu. Podobného efektu bylo dosaženo kultivací lidských i potkaních HSC na Matrigelu, který obsahuje komponenty ECM připomínající bazální membránu (Olaso, 2001). Návrat do klidového stádia byl provázen poklesem positivity pro α -SMA, poklesem exprese kolagenu typu I a zvýšením exprese MMP-1 (Sohara, 2002, Gaca, 2003). Avšak potvrzující data, která by byla získaná in vivo, stále chybí a mechanismus, který tento návrat způsobuje, zatím také není objasněn (Ramani, 2012, Friedman, 2012, Kisseleva, 2012). Proces aktivace může tlumit nejen Matrigel, ale retinová kyselina a aktivace PPAR γ receptorů (Sato, 2003).

S aktivací dochází mimo jiné také k nárůstu hladiny mRNA kolagenu I 60 – 70 krát a její poločas rozpadu vzrůstá ze 1,5 hodiny na 24 hodin. Nadprodukcí kolagenu typu I HSC zásadně ovlivňují svoje okolní prostředí (Lang, 1999). Kromě kolagenu jsou syntetizovány i jiné složky ECM, což vede ke kvantitativním a kvalitativním změnám v ECM. To má za následek interakci mezi HSC a ECM, která dokáže ovlivnit další osud buněk.

Kolagenní gel urychlil v prvních dnech růst a aktivaci N HSC, nicméně jejich další proliferaci neovlivnil. Buňky nabyly charakteristického vzhledu nalézaného in vivo, měly štíhlejší těla a delší úzké výběžky. Naopak již aktivované C3 HSC získané z poškozených jater tetrachlormethanem na kolagenním gelu ani plastu neproliferují, kolagenní gel jejich počet v závěru kultivace ovlivnil negativně. Počet buněk je zřejmě korigován apoptózou (Lee, 2003). Dvourozměrné kultivační prostředí se chová jinak. Na miskách potažených kolagenem typu I HSC více proliferují ve srovnání s kultivací na plastu, zvyšuje se i produkce kolagenu typu I (Senoo, 1994a).

Jak bylo zmíněno, rozhodujícím činitelem pokračující či naopak ustupující fibrogenese je výsledný stav počtu HSC, který vychází z poměru intenzity protichůdných procesů, kterými jsou proliferace a programovaná smrt HSC (Zhou, 2004). Jelikož se během kultivace v kolagenním gelu snížil jejich počet, vedlo nás toto zjištění k otázce, zda buňky vykazují

apoptotický charakter. V našich pokusech byla apoptóza potvrzena dvěma nezávislými metodami – fluorescenčním barvením a za pomoci průtokové cytometrie. To nám umožnilo sledovat morfologii jaderných změn a strukturu chromatinu (AO, DAPI) kombinované s propustností buněčné membrány (EtBr), a analýzu buněčného cyklu včetně vyhodnocení zastoupení apoptotického subG1 peaku pomocí průtokové cytometrie. Kombinace těchto metod nám poskytla přesnější náhled na průběh buněčných změn a ve všech případech jsme dosáhli shodného výsledku.

Apoptotický proces započatý *in vivo* byl kultivací na kolagenu významně potencován, kulminoval druhý den a apoptotický charakter vykazovalo dvakrát více C3 HSC než po izolaci. Naopak na plastu jsme zaznamenali zvýšené procento apoptotických C3 HSC s výrazným časovým odstupem. Expresí proteinu Bcl-2 i Bax u N HSC na kolagenním gelu stoupá s dobou kultivace a naopak u C3 HSC na kolagenním gelu jsou hladiny nejvyšší druhý den, kdy apoptóza prokázaná ostatními metodami dosahuje svého vrcholu.

Ve studiích prováděných *in vivo* byla zjištěna souvislost mezi apoptózou HSC a degradací kolagenu (Fallowfield, 2004). Poté co v játrech odezní toxický inzult, dochází k apoptóze HSC, k dramatickému snížení hladiny TIMP a naopak nárůstu hladin MMP, které začnou vytvořenou ECM okamžitě degradovat. Pokusy na myších prokázaly spojení mezi odbouráváním patologické matrix a apoptózou HSC. Jednalo se o navození tetrachlormethanové fibrózy mutantních r/r myší, které exprimují kolagen rezistentní vůči působení MMP. Ukázalo se, že tyto myši nebyly schopné štěpit kolagen, ale zároveň také nedocházelo k apoptóze HSC (Issa, 2004). Je tedy zřejmé, že intaktní kolagen je signálem pro přežití HSC, naopak při degradaci nově vytvořené matrix dochází ke ztrátě „záchranných signálů“ a dochází k apoptóze.

Hlavním stimulem k tvorbě kolagenu I je TGF- β a proto podávání TGF- β antagonistů je jedna z cest podpory degradace matrix. Přímé podání enzymů degradujících matrix v experimentu *in vivo* na zvířecí fibróze jater potvrdilo princip, že matrix může být resorbována. Otázkou zůstává, zda tato terapie bude klinicky přijatelná, specifická a bezpečná (Špičák, 2008).

Ke stejným závěrům jsme došli také v případě apoptózy vyvolané pomocí toxinů *in vitro* s různým mechanismem vzniku apoptózy. Porozumění kontrolním procesům HSC aktivace a apoptózy může vést k novým terapeutickým postupům k léčbě fibrózy. Jedním z nejstudovanějších je gliotoxin, který se akumuluje v hepatocytech i v HSC. Ty jsou k jeho působení citlivější, dokáže navodit apoptózu již jednou dávkou a významně tak přispět k redukci fibrózy (Wright, 2001, Hagens, 2006, Anselmi, 2007). I v našem případě došlo již po 5

hodinách po přidání gliotoxinu k navození apoptózy. Dalšími toxiny navozující apoptózu byly cykloheximid, inhibitor syntézy proteinů (Preaux, 2002) a cytochalasin D, který zasahuje do mechanismu aktinových filament (Murphy, 2002). Apoptóza může být spuštěna různými mechanismy a cestami, zajímalo nás, zdali prostředí, potažmo kolagenní gel ovlivní procesy probíhající v HSC. Zjistili jsme, že nezáleží na počátečním impulzu nebo na cestě, kterou probíhá, ale gel z kolagenu typu I ve všech případech podporoval a výrazně zvyšoval apoptózu HSC ve srovnání s kultivací na plastu. Proto se tyto látky jako gliotoxin a jemu podobné intenzivně zkoumají, abychom dovedli ovládnout převládající procesy v játrech a způsobit tak návrat do původního stavu (Hagens, 2006).

Mechanismus působení kolagenního gelu k indukci apoptózy není zatím objasněn, ale jasným závěrem naší práce je, že významně prohlubuje a urychluje apoptózu ve srovnání s kultivací totožných buněk na plastu. Aktivované HSC ovlivňují svůj vlastní osud a se vzrůstající hladinou kolagenu a jeho hromaděním v poraněných játrech zároveň mohou nastartovat svojí programovanou smrt. Jaké množství kolagenu je hraniční, nebo kde nastává tento zlomový bod, však zatím zůstává otázkou.

Tato práce přispívá k popisu dějů probíhajících během akutního poškození jater, aktivaci jaterních hvězdicových buněk, jejich apoptózy a vlivu extracelulární matrix na chování buněk. Ukazuje, že kultivace na plastovém povrchu užívaná ve většině studií není dostatečná, neboť kolagenní matrix, která se v játrech akumuluje při rozvoji jaterní fibrózy, může velmi výrazně ovlivnit životní cyklus a chování jaterních hvězdicových buněk. Celá řada otázek však zůstává nezodpovězena. Na odpovědi, jaký mechanismus startuje navození apoptózy v játrech a v jaké míře způsobuje degradace ECM apoptózu HSC či návrat do klidového stadia, si budeme muset ještě počkat.

7. SHRnutí NEJDůLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

Naším cílem bylo popsat děje, ke kterým dochází vtoxicity poškozených játrech, zaměřit se na jaterní hvězdicové buňky, proces jejich aktivace a apoptózy. Zajímalo nás, jaké nastávají změny v růstu, proliferaci, buněčném cyklu a především apoptóze HSC vlivem extracelulární matrix, zejména její v cirhotických játrech nejhojněji zastoupené složky kolagenu typu I.

Izolovali jsme hvězdicové buňky z nepoškozených jater, u kterých dochází k aktivaci in vitro při kultivaci na plastovém podkladu. Podařilo se nám zavést metodu i pro studium aktivovaných HSC izolovaných z jater poškozených tetrachlormethanem a jejich kultivaci na kolagenním gelu. Byly zavedeny metody pro detekci apoptózy pomocí fluorescenčního barvení a průtokové cytometrie. Aktivované HSC kultivované na plastu a na kolagenním gelu byly vystaveny působení třech různých toxinů pro navození apoptózy in vitro. Byl použit gliotoxin, cykloheximid a cytochalasin D, neboť indukují apoptózu rozdílnými cestami a opět byl sledován vliv trojrozměrné kolagenní matrix.

Prokázali jsme, že se HSC, jež jsou hlavním zdrojem extracelulární matrix v játrech, kultivací na plastu aktivují, proliferyjí a mění svůj fenotyp. Během aktivace došlo k řadě změn v expresi různých skupin genů, ty se exprimovaly v menší či větší míře, například byly zvýšené exprese genů pro složky ECM (prokolagen typu I, III, fibronectin) a na druhé straně došlo k downregulaci některých genů, např. u řady metaloproteináz a syndekanu. Zjistili jsme, že gel z kolagenu typu I, hlavní komponenty jaterní extracelulární matrix fibrotických sept a jeho trojrozměrná struktura ovlivňuje růst a proliferaci buněk a zároveň se významnou měrou podílí na dynamice apoptotického procesu. Na druhou stranu způsobuje také návrat části aktivovaných HSC zpět do klidového stavu, jak bylo prokázáno morfologicky i sníženou expresí alfa hladkosvalového aktinu. Překvapivým výsledkem pro nás bylo, že nehledě na to, zdali byla apoptóza HSC indukovaná in vivo nebo in vitro použitím toxinů, a tudíž aniž by byl rozlišován původ jejího vzniku či mechanismus působení, gel z kolagenu typu I apoptózu vždy iniciuje, zintenzivňuje a urychluje. Významně ovlivnil expresi důležitých pro- či anti-apoptotických členů Bcl-2 rodiny, došlo ke změně apoptotického poměru Bcl2/Bax a tak ovlivňuje následný osud hvězdicových buněk v játrech. Interakce jaterních hvězdicových buněk v poškozených játrech se složkami extracelulární matrix hraje důležitou roli v návratu fibrotického poškození k původnímu stavu.

8. ZÁVĚR

V naší práci jsme se věnovali studiu jaterních hvězdicových buněk, procesu aktivace a apoptózy a vlivu gelu z kolagenu typu I. HSC hrají ve fibrotickém procesu důležitou roli a plní celou řadu funkcí. V důsledku své aktuální funkce mohou mít různé fenotypy a jim odpovídající morfologii, funkci a genovou expresi. Porovnávali jsme HSC v klidovém stavu, aktivované in vitro kultivací na plastu, což je obecně přijímaný a používaný model pro studium HSC, a HSC aktivované in vivo podáváním tetrachlormetanu potkanům.

HSC se z klidového stavu, kdy uchovávají vitamin A a mají typické výběžky, transdiferencují na buňky s myofibroblastovým genotypem i fenotypem a ztracují tukové kapénky. Aktivované HSC se vyznačují pozitivitou alfa hladkosvalového aktinu, který umožňuje kontraktilitu. Ten se s delší kultivací na kolagenním gelu u části buněk vytrácí a potvrzuje tak teorii, že se část aktivovaných HSC navrácí do klidového stádia. Část aktivovaných buněk však podléhá apoptóze, pomocí které se reguluje nadbytečný počet ECM produkujících buněk v játrech. Přežití či setrvávání HSC v místě akutního poškození a tvořící se jizvy má zásadní vliv na proces reparace.

Naše práce ukázala, že procento apoptotických buněk kultivovaných na kolagenním gelu bylo výrazně vyšší, stejně jako se zvyšoval apoptotický index proteinů Bcl-2 rodiny. Kolagenní gel zároveň potencoval a urychloval apoptózu vyvolanou toxiny, je tedy jedno čím byl apoptotický proces způsoben. Proč kolagen způsobuje akceleraci apoptózy, a jakým mechanismem to způsobuje, zatím není známo. Existují teorie, že důležitou interakci v celém procesu hraje i degradace matrix, ale potvrzující data zatím nejsou k dispozici. Závěrem lze tedy říci, že nezáleží na tom, jakým způsobem byla apoptóza způsobena, ale kolagenní matrix, která se v játrech akumuluje při rozvoji jaterní fibrózy, tento proces urychluje a může velmi výrazně ovlivnit životní cyklus a chování jaterních hvězdicových buněk. Přestože je trojrozměrný gel bez přítomných ostatních buněk pro HSC zjevně stále uměle vytvořeným prostředím, předpokládáme, že naše studie pomohla získat lepší pohled na děje v játrech, zejména na apoptotické procesy.

Celá řada nových poznatků dává jasně najevo, že je jaterní fibróza reverzibilní. Apoptóza hraje důležitou úlohu, experimentální stimulace a urychlení jejího procesu je jedna z možných cest antifibrotické terapie, kterou lze jaterní fibrózu ovlivnit a způsobit tak eliminaci aktivovaných buněk. Přesto je zřejmé, že pokročilá cirhóza už se nemůže navrátit do úplně původního stavu a vyléčení záleží na etiologii a stadiu poškození jater.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANT	adenin nucleotid transporter
AO	akridinová oranž
Bgn	biglykanu
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
BIRP	baculovarial IAP
CARD	caspase activation and recruitment domain
CCl ₄	tetrachlormethan
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
CHX	cykloheximid
Col 1, 3	prokolagen I, III
CYT D	cytochalasin D
DAPI	4', 6-Diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermal growth factor
Eln	elastin
EtBr	ethidium bromid
Fbln 2	fibulin
Fbn 1	fibrilin
FGF	fibroblast growth factor
Fn 1	fibronektin
GAG	glykosaminoglykany
GFAP	glial fibrillar acidic protein
GLT	gliotoxin
HBSS	Hanksův roztok
HE	hematoxylin-eozin
HGF	hepatocyte growth factor
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICE	interleukin-1b Converting Enzyme
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin

iNOS	nitric oxide synthase
Itga 6	integrin α 6
Itgb 3	integrin β 3
KLF	Kruppel-like faktory
LDH	laktátdehydrogenáza
Lum	lumikan
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
MMP	metaloproteináza
NADH	redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
NASH	nealkoholová steatohepatitida
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NF κ B	nukleární faktor κ B
NGFR	nerve growth factor receptor
NT-3	neurotrofin
PARP	poly-ADP-ribose-polymerase
PDGF	destičkový růstový faktor
Plc	perlekan
RBP	protein vázající retinol
ROS	reaktivní formy kyslíku
Sdc3	syndekan
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLRP	small leucine-rich proteoglycans
SPARC	secreted protein rich in cysteine
STAT-1	signal transducers and activators of transcription
TGF- β	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis - inducing ligand
VDAC	voltage-dependent anion channels
VEGF	vascular endothelial growth factor
α -SMA	α aktin hladkého svalu

10. LITERATURA

Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 1994; 20: 494-51.

Anselmi K, Stolz DB, Nalesnik M, Watkins SC, Kamath R, Gandhi CR. Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: exacerbation by caspase and serine protease inhibition. *J Hepatol* 2007; 47:103-113.

Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem* 2004; 256-257:141-55.

Baigrie RJ, Cullis SN, Ndhluni AJ, Cariem A, *Br J Surg*. Randomized double-blind trial of laparoscopic Nissen fundoplication versus anterior partial fundoplication. *Br J Surg* 2005; 92:819-23.

Baker AJ, Mooney A, Hughes J, et al. Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994; 94:2105–16.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115(2):209-18. Erratum in: *J Clin Invest* 2005; 115:1100.

Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003; 200:504-15.

Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46:443-6.

Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:373-84.

Binder C, Schulz M, Hiddemann W, Oellerich M. Induction of inducible nitric oxide synthase is an essential part of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in MCF-7 and other epithelial tumor cells. *Lab Invest* 1999; 79:1703-12.

Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990; 250:399-404

- Cales P. Apoptosis and liver fibrosis: antifibrotic strategies. *Biomed & Pharmacotherapy* 1998; 52:259–263.
- Canbay A, Taimr P, Torok B, Higuchi H, Friedman S, Gores G. Apoptotic body Engulfment by Human Stellate Cell Line Is Profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83/5(655-63).
- Canbay A., Friedman S, Gores G. Apoptosis: The nexus of liver and fibrosis. *Hematology* 2004; 39:273 – 278.
- Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308(3):1191-6.
- Carlioni V, Romanelli RG, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1127-36.
- Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33:148-58.
- Colette CP, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: Where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12:509-515.
- Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modelling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117:237–250.
- Cory S, Adams J. M.: The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 647–656.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63:21–9.
- De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-93.
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007;132:1937-46.

Desmouliere A, Redard M, Darby I, et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146:56–66.

Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927–939.

Fallowfield JA, Iredale JP. Reversal of liver fibrosis and cirrhosis-an emerging reality. *Scott Med J* 2004; 49:3-6.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-50.

Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105.

Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43: S82-S88.

Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655–1669.

Friedman SL. Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:9230-1.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.

Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 411-24.

Gaca MD, Zhou X, Issa R, et al. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol* 2003; 22:229–239.

Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-35.

Genovese F, Barascuk N, Larsen L, Larsen MR, Nawrocki A, Li Y, Zheng Q, Wang J, Veidal SS, Leeming DJ, Karsdal MA. Biglycan fragmentation in pathologies associated with extracellular matrix remodeling by matrix metalloproteinases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6(1):9.

Graham JM. Fractionation of hepatic nonparenchymal cells. *ScientificWorldJournal* 2002; 2: 1347-50.

Gressner, OA, Rizk MS, Kolavne E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic road map of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastro Hepatol* 2008; 23:1024-35.

Habens F, Srinivasan N, Oakley F, et al. Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF- κ B inhibitory and apoptosis promoting activity. *Apoptosis* 2005;10:481–491.

Hagens WI, Olinga P, Meijer DKF, Groothuis GMM, Beljaars L, Poelstra K. Gliotoxin non-selectively induces apoptosis in fibrotic and normal livers. *Liver Int* 2006; 232-239.

Hemann S., Graf J., Roderfeld M., Roeb E., Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46:955-75.

Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, Tsukamoto H. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004; 279(6):4820-8.

Hogemann B, Edel G, Schwarz K, Krech R, Kresse H: Expression of biglycan, decorin and proteoglycan-100/CSF-1 in normal and fibrotic human liver. *Pathol Res Pract* 1997, 193:747-751.

Hubel E, Fishman S, Halpern Z, Oren R, Zvibel I. Neutrophins induce activation of hepatic stellate cells at early stages of activation. *Journal of Hepatology* 2011; S423-S424.

Hunzelmann N, Anders S, Sollberg S, Schönherr E, Krieg T. Co-ordinate induction of collagen type I and biglycan expression in keloids. *Br J Dermatol* 1996; 135:394-9.

Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1352-1364.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Chor SY, Hui AY, To KF, Chan KK, Go YY, Chan HL, Leung WK, Sung JJ. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of herbal medicine on hepatic stellate cell. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2):180-6.

Imai K, Sato T, Senoo H. Adhesion between cells and extracellular matrix with special reference to hepatic stellate cell adhesion to three-dimensional collagen fibers. *Cell Struct Funct* 2000; 25:329-36.

Iredale et al. Hepatic Stellate Cells Express the Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor p75 and Undergo Apoptosis in Response to Nerve Growth Factor Stimulation. *Am J Pathol* 2000; 156:1235 – 124.

Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102:538-549.

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-48.

Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 587-93.

Issa R, Zhou X, Trim N, et al.: Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *Faseb J* 2003; 17: 47–49.

Issa R, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004; 126:1795–1808.

Iwamoto H, Sakai H, Tada S, Nakamuta M, Nawata H. Induction of apoptosis in rat hepatic stellate cells by disruption of integrin-mediated cell adhesion. *J Lab Clin Med* 1999;134(1):83-9.

Jaatela M.: Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004; 23: 2746–2756.

Ji G, Wang L, Zhang SH, Liu JW, Zheng PY, Liu T. Effect of Chinese medicine Qinggan Huoxuefang on inducing HSC apoptosis in alcoholic liver fibrosis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2047-2052.

Jiang Y, Liu J, Waalkes M, Kang YJ. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice. *Toxicol Sci* 2004; 79: 404-10.

Jiroutová A, Majdiaková L, Čermáková M, Köhlerová R, Kanta J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic liver. *Acta Med* 2005; 48, 137-144.

Jiroutova A, Slavkovsky R, Cermakova M, Majdiakova L, Hanovcova I, Bolehovska R, Hajzlerova M, Radilova H, Ruzsova E, Kanta J. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts *Exp Toxicol Pathol* 2007; 58(4):263-73.

Kim KA, Lim YS, Kim KM, Yoon JH, Lee HS. 15d-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 modulates collagen type I synthesis in human hepatic stellate cells by inducing oxidative stress. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73(5):361-7.

Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80: 697-707.

Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:496-503.

Kisseleva T, Brenner D. Stellate Cell Biology. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepat* 2006; 21: S84-S87.

Kisseleva T, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:9448–9453.

Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 1999; 112:387-401.

Krishnan A, Li X, Kao WY, Viker K, Butters K, Masuoka H, Knudsen B, Gores G, Charlton M. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Lab Invest* 2012; 92(12):1712-25.

Kweon YO, Paik YH, Schnabl B, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39:38-46.

Kawada N. Human hepatic stellate cells are resistant to apoptosis: implications for human fibrogenic liver disease. *Gut* 2006; 55:1073-1074.

Lang A, Brenner DA. Gene regulation in hepatic stellate cells. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 1-1073-179.

Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, Moon YM. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39:960-6.

Lee SH, Zhao YZ, Park EJ, Che XH, Seo GS, Sohn DH. 2', 4', 6'-Tris (methoxymethoxy) chalcone induces apoptosis by enhancing Fas-ligand in activated hepatic stellate cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 658:9-15.

Lee U, Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 195–206.

Li LY, Tao JC, Davaille J, Feral C, Mallat A, Rieusset J, Vidal H, Lotersztajn S. 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts - A pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 2001; 276:38152-38158.

Lin HJ, Tseng CP, Lin CF, Liao MH, Chen CM, Kao ST, Cheng JC. A Chinese Herbal Decoction, Modified Yi Guan Jian, Induces Apoptosis in Hepatic Stellate Cells through an ROS-Mediated Mitochondrial/Caspase Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011:459531.

Lui X-J, Yang L, Lou F-M, Wu H-B, Qiang Q. Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1600–1607.

Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005; 45:605-628.

Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004; 40:1151-9.

Masopust J., Bartůňková J., a spol.: *Patobiochemie buňky*. LF HK Praha, 2003

Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U. et al. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 2005; 857–867.

Montiel-Duarte C, Varela-Rey M, Osés-Prieto JA, Lopez-Zabalza MJ, Beitia G, Cenarruzabeitia E, Iraburu MJ. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") induces apoptosis of cultured rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588:26-32.

Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: Translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:695-714.

Murphy FR, Issa R, Zhou X. et al. : Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277:11069-76.

Neubauber K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1996; 24:719-30.

Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006; 55:1174-82.

Oakley F, Meso M, Iredale JP, et al. Inhibition of nB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2005; 128:108-20.

Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108:1369-1378.

Otto DA, Veerch RL. Isolation of a lipocyte-rich fraction from rat liver nonparenchymal cells. *AdvExp Med Biol* 1980; 132:509-517.

Orr JG, Leel V, Cameron GA, Marek CJ, Haughton EL, Elrick LJ, et al. Mechanism of action of the antifibrogenic compound gliotoxin in rat liver cells. *Hepatology* 2004; 40:232-242.

Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EBM, Vogt M, Myers C, Parks T, Waring P, Mullbacher A, Czernilofsky AP, Baeuerle PA. The immunosuppressive fungal metabolite Gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183:1829-1840.

Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18:2-13.

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-412.

Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7:d1720-6.

Preaux AM, D'Ortho MP, Bralet MP, Laperche Y, Mavier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology* 2002; 36:615-622.

Příbramská V, Husová L, Jaterní cirhóza; *Interní Med* 2007; 9:486–489.

Ramadori G, Saile B.: Mesenchymal cells in the liver – one cell type or two? *Liver* 2002; 22: 283 – 294.

Ramani K, Tomasi ML, Yang H, Ko K, Lu SC. Mechanism and significance of changes in glutamate-cysteine ligase expression during hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287:36341-55.

Rippe RA, Brenner DA. From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 127:1260-2.

Rippe, R. Brenner, From quiescence to activation: Gene regulation in hepatic stellate cells *Gastroenterology* 2004; 4:1260-1262.

Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grötzing J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *Faseb J* 2006; 20:444-54.

Rubtsova SN et al. Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett* 1998; 430:353-357.

Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R.: Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29:93-101.

Sato M, Sato T, Kojima N, Imai K, Higashi N, Wang DR, Senoo H. 3-D structure of extracellular matrix regulates gene expression in cultured hepatic stellate cells to induce process elongation. *Comp Hepatol* 2004; 3 Suppl 1:S4.

Sato M, Suzuki S, Senoo H: Hepatic Stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and function* 2003; 28: 105-112.

Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phosphate further modulates morphology, proliferation, and collagen synthesis of the perisinusoidal stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 999-1006.

Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formation. *Kaibogaku Zasshi* 1994; 69:719-33.

Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Hata R. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol Int* 1996; 20:501-12.

Shao R, Yan W, Rockey DC. Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem* 1999; 274: 3228-34.

Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y.: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 483 – 487.

Schnabel C, Sawitza I, Tag C., Lahme B, Gressner A, Breitkopf K. Expression of cytosolic and membrane associated tissue transglutaminase in rat hepatic stellate cells and its upregulation during transdifferentiation to myofibroblasts in culture. *Hepatology Research* 2004; 140–145.

Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 351-372.

Schuppan D., Structure of extracellular matrix in normal and fibrotic liver:collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990;10:1–10.

Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *Journal of hepatology* 2002; 37:214-221.

Špičák Julius, Taimr Pavel a kolektiv. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*, 1. vydání, Praha 2008, 464s ISBN 978-80-247-1783-8. Kapitola 1:Fibróza jater s. 5-57.

Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003; 37:87-95.

Trim N, Issa R, Krane S, Benyon RC, Iredale JP.: Intact collagen-1 inhibits hepatic stellate cell activation and promotes persistence of activated HSC in vivo. *Hepatology* 2000; 32: 183A.

Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic Stellate Cells Express the Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor p75 and Undergo Apoptosis in Response to Nerve Growth Factor Stimulation. *American Journal of Pathology* 2000; 156:1235–124.

Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364:33-60.

Wake K. Karl Wilhelm Kupffer And His Contributions To Modern hepatology. *Comparative Hepatol* 2004; Suppl 1:S2.

Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273:302-8.

Wang B, Treatment of chronic liver diseases with traditional Chinese medicine. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl:E67-70.

Wasser S, Tan CE. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28:109-111.

Wells RG, The role of matrix stiffness in hepatic stellate cells activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:S158-61.

Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJP, Iredale JP, Mann DA. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastro* 2001; 121:685-698.

Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol*. 2000; 35:665-72.

Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8:511-514.

Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez D E, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2002; 32:1248–1254.

Zeng X, Zhao C, Wang H, Li S, Deng Y, Li Z. Dimethyl sulfoxide decrease type-I and –III collagen synthesis in human hepatic stellate cells and human foreskin fibroblasts. *Adv Sci Lett* 2010; 3:496-499.

Zhang BJ, Xu D, Guo Y, Ping J, Chen LB, Wang H. Protection by and anti-oxidant mechanism of berberine against rat liver fibrosis induced by multiple hepatotoxic factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:303-9.

Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002; 8:515-519.

Zhou X, Jamil A, Nash A, Chan J, Trim N, Iredale JP, Benyon RC. Impaired proteolysis of collagen I inhibits proliferation of hepatic stellate cells: implications for regulation of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2006; 281:39757-65.

Zhou XL, Murphy FR, Gehdu N, Zhang J, Iredale JP. Engagement of α v β 3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004; 279:23996-4006.

Zhou, X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24:492-501.

11.PŘÍLOHY