

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové
(další specifikace neuvádět)



Vliv složek extracelulární matrix na buňky kultivované *in vitro*

Eva Peterová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program *Lékařská chemie a biochemie*

Hradec Králové

2016

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a později kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Eva Peterová
Ústav lékařské biochemie

Školitel: Mgr. Alena Mrkvicová, Ph.D.
Ústav lékařské biochemie

Oponenti: jména se všemi tituly včetně uvedení pracoviště

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
..... v od hod.
(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantů:
GAUK 699912
PRVOUK P37/01
SVV-2012-264901
SVV-2013-266901
SVV-2014-260058

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie
Garant studijního programu

1. SOUHRN

Rozhodující událostí v patogenezi jaterní fibrózy je expanze myofibroblastů (MFB). Aktivace jaterních hvězdicových buněk (HSC) na MFB vede ke zvýšení produkce extracelulární matrix (ECM). V naší práci jsme studovali vliv růstového faktoru fibroblastů 1 (FGF-1) na jaterní MFB. V druhé části jsme studovali vliv transformujícího růstového faktoru $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) a FGF-1 na buněčnou linii HSC-T6. Buňky byly kultivovány na plastových miskách a v 3D prostředí kolagenního gelu napodobujícího fibrotickou tkáň.

MFB byly izolovány opakovaným pasážováním frakce neparenchymových jaterních buněk. Přenos MFB z plastu do kolagenu vedlo ke změnám v jejich morfologii a fenotypu. Expresí cytokinu TGF- $\beta 1$ a MFB markerů hladkosvalového α aktinu (α -SMA) a buněčného fibronektinu (FN-EDA) byla výrazně tlumena v kolagenním geleu. Experimenty s SB 431542 inhibítorem receptoru pro TGF- β I ukázaly, že expresí FN-EDA je závislá na TGF- $\beta 1$, zatímco α -SMA je exprimován zejména pod vlivem kultivačního prostředí a až poté modulován pomocí TGF- $\beta 1$. Kolagenní gel nemění expresi želatinázy (MMP-2), ale aktivuje její proenzym. FGF-1, který je pravděpodobně zapojen do regulace jaterní fibrózy, snižuje expresi α -SMA a zvyšuje expresi FN-EDA v buňkách na plastu. Na buňky v gelu má FGF-1 mírnější vliv.

Buněčná linie HSC-T6 představuje dobře zavedený model aktivovaných HSC. Tyto buňky po stimulaci TGF- $\beta 1$, která vyvolává MFB diferenciaci a produkci ECM, silně exprimují α -SMA a FN-EDA. FGF-1/H snížil jejich množství na úroveň srovnatelnou s neovlivněnými buňkami. Přídavek FGF-1 také mírně potlačil sekreci želatináz do kultivačního média, ale pouze v buňkách na kolagenním gelu. Kultivace v kolagenním gelu vede ke změnám v morfologii buněk a snižuje expresi α -SMA. Stimulace buněk TGF- $\beta 1$ vede k nárůstu expresí FN-EDA, ale ne α -SMA. I když buňky na plastu a v kolagenním gelu vykazují různé vlastnosti, FGF-1 snižuje expresi FN-EDA v obou prostředích.

Narušení TGF- $\beta 1$ signální dráhy představuje potenciální strategii pro léčbu fibrózy. Prokázali jsme, že FGF-1 by mohl antagonizovat signály iniciované TGF- $\beta 1$ a ovlivňovat tak progresi jaterní fibrózy.

2. SUMMARY

Myofibroblast expansion is a critical event in the pathogenesis of liver fibrosis. The activation of hepatic stellate cells (HSC) to myofibroblast (MFB) results in the enhanced production of extracellular matrix (ECM). We have studied the effect of fibroblast growth factor 1 (FGF-1) on liver MFB. In the second part we investigated effect of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and FGF-1 on cell line HSC-T6. Cells were cultured on plastic dishes and in 3D collagen gel mimicking fibrotic tissue.

MFB were isolated by repeated passaging of nonparenchymal liver cell fraction. The transfer of MFB from plastic dishes to collagen gel resulted in the change in their shape and phenotype. The expression of cytokine TGF- β 1 and of MFB markers, α -smooth muscle actin (α -SMA) and cellular fibronectin (EDA-FN) on protein level was significantly decreased in collagen gel. The experiments with SB 431542, the inhibitor of TGF- β receptor type I, showed that EDA-FN and α -SMA are differently regulated. EDA-FN expression is dependent on TGF- β 1, while the expression of α -SMA is primarily determined by the environment and modified by TGF- β 1. EDA-FN is more sensitive to the U0126, the inhibitor of protein kinases MEK 1 and 2. Collagen gel does not change the expression of metalloproteinase MMP-2 but activates the proenzyme. FGF-1, the cytokine possibly involved in liver fibrosis, decreases the expression of α -SMA and increases the expression of EDA-FN in the cells on plastic when used in combination with heparin. The action of FGF-1 is milder in the gel.

HSC-T6 cell line represents well-established model of activated HSC. These cells strongly expressed α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin (FN-EDA) after stimulation with TGF- β 1, which is a stimulus for MFB differentiation and ECM production. FGF-1 reduced proteins expression to levels comparable with untreated cells. Mild repression of secreted gelatinases was seen in culture media after FGF-1 treatment. The exposure of cells to collagen gel leads to changes in cell morphology and in expression of MFB markers. Lack of α -SMA in cells embedded to collagen gel was detected. When stimulated with TGF- β 1, the cells increased expression of FN-EDA, but not α -SMA. Although the cells on plastic and in collagen gel show different properties, FGF-1 reduced expression of FN-EDA in both conditions.

Disrupting TGF- β 1 signalling pathway represents a potential strategy for the treatment of fibrosis. We showed that FGF-1 could antagonize signals initiated by TGF- β 1 and had influence on progression of liver fibrosis.

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1. Jaterní fibróza

Jaterní fibróza je dynamický proces charakteristický nadměrnou kumulací složek extracelulární matrix (ECM). Jedná se reakci na chronické poškození jater, kdy nekrotická tkáň je nahrazována vazivem. První klinické studie zabývající se potenciální reverzibilitou jaterní fibrózy proběhly už v roce 1970, ale větší pozornosti se dočkaly až o deset let později, kdy byly za producenty kolagenu v játrech označeny jaterní hvězdicové buňky (HSC) (Bataller a Brenner 2005). Po poškození jater dochází k proliferaci a aktivaci HSC. Výsledkem aktivace je přeměna na myofibroblasty (MFB).

Při studiu jaterní fibrózy se používají jak zvířecí *in vivo* modely tak *in vitro* modely. V *in vivo* modelech se fibróza resp. cirhóza vyvolává toxickým poškozením jater zvířete například podáním tetrachlormetanu, thioacetamidu nebo dimethylnitrosaminu. V naší práci jsme používali *in vitro* model, kdy jsme izolovali neparenchymovou frakci jaterních buněk z potkaních jater. Opakovaným pasážováním na plastových Petriho miskách jsme získali buňky s myofibroblastickým fenotypem (Knittel a spol. 1999, Ogawa a spol. 2007, Jiroutová a spol. 2013). Jako model aktivovaných HSC jsme použili buněčnou linii HSC-T6, jeden z klonů izolovaných z jater potkana kmene Sprague-Dawley Dr. Friedmanem.

3.2. Extracelulární matrix

ECM je složena z glykosaminoglykanů, proteoglykanů, glykoproteinů, kolagenů a z multiadhezních molekul. V nepoškozených játrech ECM tvoří nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně a poskytuje signály pro přítomné buňky (hepatocyty, HSC, MFB, epitelální buňky, atd.). Adhezivní interakce mezi buňkami a proteiny ECM hrají důležitou roli v embryonální morfogenezi a v regulaci genové exprese v buňkách dospělého organismu (Juliano a Haskill 1993).

Jaterní fibróza je spojena s velkými změnami v kvantitě i kvalitě ECM. V pokročilých stádiích játra obsahují až šestkrát větší množství ECM s převahou kolagenu typu I. Na ECM jsou navázány cytokiny a růstové faktory, které se v případě poškození tkáně uvolňují a zesilují fibrotizační pochody. Hlavními producenty ECM v poškozených játrech jsou aktivované HSC a MFB.

Fyziologická i patologická ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní složky. V lidském těle se nachází více než dvacet typů kolagenu, přičemž v lidských játrech bylo dosud nalezeno deset různých typů. Ve fibrotických játrech je obsah kolagenu zvýšen, až čtrnáctkrát. Stoupá zastoupení fibrilárních kolagenů typu I, III a V (Gressner a Weiskirchen 2006). Kolagen typu I se často volí jako 3D kulturační prostředí, protože tvoří prostředí bližší živému modelu než polystyrenová Petriho miska.

Množství a kvalita ECM je závislá na syntéze a degradaci jejích složek. Při degradaci fibrotické tkáně v játrech se uplatňují enzymy matrix metaloproteinázy (MMP), které jsou produkovány především HSC (Li a Friedman 2001). Jedná se o skupinu zinek-dependentních enzymů se schopností štěpit téměř všechny složky ECM a bazální membrány.

Produkce účinných MMP závisí nejen na genové expresi, ale i na aktivaci MMP prekurzorů a na množství produkovaných tkáňových inhibitorů matrix metaloproteináz (TIMP). TIMP 1-4 jsou tvořeny řadou buněk mimo jiné i MFB, HSC, endotelovými buňkami, makrofágy a monocyty, které se nacházejí v jaterní tkáni. Hlavní funkcí TIMP je inhibice MMP. Mimo toho působí TIMP-1 jako růstový faktor pro řadu buněk (Hayakawa a spol. 1992) a potlačuje apoptózu HSC (Lin a spol. 2001).

3.3. Fibrogenní buňky v játrech

3.3.1. Hvězdicové buňky

HSC spolu s portálními fibroblasty a v malé míře i s hepatocyty jsou zdrojem buněk myofibroblastického fenotypu. Za fyziologických podmínek je jejich hlavní funkcí skladování vitamínu A v charakteristických tukových kapénkách ve formě esterů retinolu-retinoidů. Po poškození jater dochází k proliferaci a aktivaci HSC, změnám v jejich genové expresi a změně fenotypu. Výsledkem aktivace je přeměna na buňky myofibroblastického typu (Friedman 2000). Jsou schopné syntetizovat složky ECM, cytokiny, růstové faktory, MMP a jejich TIMP.

Aktivované HSC jsou charakteristické expresí α -SMA. Díky α -SMA mají buňky schopnost kontrakce, která umožňuje zmenšení plochy poraněné tkáně (Rockey a spol. 1993). Produkují cytokiny TGF- α (Transformující růstový faktor α) a EGF (Epidermální růstový faktor), potřebné pro proliferaci jaterních buněk při regeneraci (Li a Friedman 2001). Zánětlivou reakci v játrech podporují aktivované HSC tvorbou růstových faktorů makrofágů (M-CSF) a monocytů (MCP-1) (Czaja a spol. 1994).

3.3.2. Myofibroblasty

MFB jsou tvořeny z aktivovaných HSC, portálních fibroblastů a v malé míře i hepatocytů a buněk kostní dřeně. Hlavním markerem myofibroblastického fenotypu je exprese α -SMA. MFB mají podobný vzhled a funkci bez ohledu na typ tkáně (Shirol a Shirol 2012).

V jaterní tkáni byly doposud rozlišeny tři typy MFB (Cassiman a spol., 2002). Portální MFB nacházející se okolo malých portálních cév a žlučovodů, které proliferují u chronických cholestatických lézí a iniciují ukládání kolagenu (Kinnman a Housset 2002, Magness a spol., 2004). Septální MFB jsou lokalizované na rozhraní mezi parenchymem a fibrotickými septy. Odlišnou subpopulací jsou tzv. interface MFB, které se nacházejí v oblasti mezi parenchymem a stromatem portálních polí nebo sept.

3.4. Růstové faktory modulující buněčný fenotyp

3.4.1. TGF- β 1

TGF- β je u savců přítomen ve třech izoformách, které jsou kódovány různými geny na různých chromozomech. Všechny tři izoformy jsou vylučovány mnoha typy buněk, jako biologicky inaktivní agregáty. TGF- β 1 izoforma je silně exprimována při nemocech charakterizovaných fibrózou.

Receptory pro TGF- β existují ve třech izoformách. Typy receptorů I a II mají serin/threonin kinázovou aktivitu (Liu a spol. 2011) a mají vysokou afinitu k TGF- β 1. Receptor typu III je tvořen transmembránovým betaglykanem (Lambert a spol. 2011). Receptory tvoří homo i heterodimery. Po vytvoření komplexu TGF- β 1 s heterodimerním receptorem I a II dochází k fosforylaci Smad 2 a 3. Fosforylované proteiny Smad 2 a 3 vstupují do buněčného jádra a regulují transkripci specifických genů (Inagaki and Okazaki 2007). Kromě TGF- β indukované signální transdukce Smad jsou dobře známy Smad nezávislé signální dráhy, například ERK1/2 a p38 (O'Connor a Gomez 2013, Leask and Abraham 2004).

TGF- β 1 lze považovat za hlavní profibrogenní cytokin. Pod jeho vlivem dochází k aktivaci HSC a fibroblastů na myofibroblasty. TGF- β 1 indukuje expresi SMA- α ve fibroblastických buňkách různého původu (Malmström a spol. 2004, Meyer-terc-Vehn a spol.

2006, Hinz 2007). Zvýšené hladiny TGF- β 1 Stimuluje syntézu buněčného fibronektinu a jeho začlenění do ECM (Ignotz a Massagué 1986, Ramadori a spol. 1992). Buněčný fibronektin (FN) existuje ve dvou variantách a, to FN-EDA a FN-EDB. TGF- β 1 podporuje hromadění FN-EDA izoformy (Muro a spol. 2007, Serini a spol. 1998).

3.4.2. FGF-1

Růstové faktory fibroblastů FGF jsou strukturně podobné polypeptidy, které mají z 30–50 % homologní sekvence aminokyselin. Lidské FGF kóduje 22 genů. Tato rodina obsahuje minimálně 22 typů proteinů, které byly lokalizovány v různých tkáních (Baker a Los 2013). Jsou nezbytné pro normální vývoj a údržbu tkání a při hojení ran (Böttcher a Niehrs 2005).

FGFR jsou povrchově vázané tyrozinkinázové receptory. Extracelulární část obsahuje, tři imunoglobulinům podobné domény a heparin vázající doménu. Dále obsahuje transmembránovou doménu a intracelulární doménu s tyrozinkinázovou aktivitou. Specifita receptoru pro různé typy FGF je dána alternativním sestřihem v imunoglobulinům podobné doméně III. Alternativní sestřih mRNA vytvoří několik forem FGF receptoru, které se liší ve své extracelulární sekvenci a mají unikátní ligand-vazebné vlastnosti.

Pro správnou biologickou aktivitu FGF je nezbytná vazba na heparansulfát respektive heparin. Afinita FGF k heparansulfátu omezuje jejich difuzi a uvolňování do intersticiálního prostoru. Pokud je heparansulfát lokalizován v ECM váže se na C-konec řetězce FGF a mění jeho konformaci. Stabilizuje FGF a prodlužuje tak jeho biologický poločas (Damon a spol., 1989, Klagsbury 1990). Chrání FGF před proteázami a kyselinami (Yayon a spol., 1991). Heparansulfát se může nacházet také na membráně buněk, kde tvoří komplexy s FGF a jejich receptory, čímž zesilují signál v buňce (Ornitz 2000).

Játra hlodavců i člověka obsahují FGF-1 (kyselý FGF, aFGF) i FGF-2 (bazický FGF, bFGF), přičemž v nepoškozených játrech převažuje aktivita FGF-1 (Nagasaki a Lieberman, 1991). Ve fibrotických játrech se zvyšuje především exprese FGF-2. Největší množství FGF-1 a FGF-2 je v mozkové tkáni, ale jsou syntetizovány téměř všemi buňkami mesodermálního a neuroektodermálního původu (Yayon a spol. 1991).

FGF-1 je významným mitogenem pro hepatocyty (Tanahashi a spol. 1994) a ovlivňuje morfogenezi a diferenciaci jater. Při absenci FGF-1 a FGF-2 je patrná výrazná nekróza hepatocytů. FGF-1 potlačuje expresi kolagenu typu I a indukuje syntézu MMP-1 v plicních fibroblastech in vitro (Becerril a spol, 1999) a v MFB oční rohovky snižuje expresi α -SMA (Maltseva et al., 2001). FGF-1 působí jako antagonist TGF- β 1, který expresi α -SMA potencuje (Ramos a spol. 2010). Účinky FGF-1 by tedy mohly být charakterizovány jako indukce antifibrotického fenotypu (obr. č. 6). Po toxickém poškození jater tetrachlormetanem klesá u knockoutovaných myší postrádajících geny pro FGF-1 i FGF-2 fibrotická reakce (Yu et al., 2003). Při absenci FGF-1 a FGF-2 dochází k poruchám produkce ECM. FGF-1 se účastní regenerace jater, ale jeho působení na jaterní tkáň je ještě málo prozkoumáno.

4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem naší práce bylo:

- 1) Sledovat účinky růstového faktoru FGF-1 v kombinaci s heparinem na primokulturu jaterních myofibroblastů získaných ze zdravých jater potkanů, a to jak ve standardním kultivačním prostředí na plastu tak v 3D prostředí kolagenního gelu.
- 2) Sledovat účinky růstových faktorů TFG- β 1 a FGF-1 na buněčnou linii HSC-T6 na plastu a v 3D prostředí kolagenního gelu.

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1. Laboratorní zvířata

Projekt práce byl schválen odbornou komisí pro ochranu laboratorních zvířat proti týrání Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze (LFUK HK). Veškeré práce s laboratorními zvířaty byly prováděny ve viváriu LFUK HK. Pro pokusy byli použiti samci potkanů kmene Sprague-Dawley (Anlab-Praha), o hmotnosti 350–450 g. Potkani byli chováni v místnostech se stálou teplotou 22°C a dvanácti hodinovými cykly střídání světla a tmy. Standardní laboratorní dieta byla potkanům podávána *ad libitum*.

5.2. Perfuze jater a izolace jaterních MFB

Perfuzе jater i izolace neparenchymové frakce jaterních buněk jsou specifikovány v Peterová a spol. 2016.

5.3. Kultivace buněk

Jaterní myofibroblasty byly získány opakovaným pasážováním neparenchymové frakce jaterních buněk. Po čtvrté pasáži byla část buněk rozsuspendována v 0,1% kolagenním gelu a část buněk byla vysazena na plast. Kultivační podmínky jsou uvedeny v Peterová a spol. 2016. Po 24 hodinové kultivaci byl přidán FGF-1 (Peprotech) a heparin (Sigma) popř. inhibitory SB431542 (100 nmol/ml, Sigma) nebo UO126 (30 nmol/ml, Cell Signaling). Doba kultivace i koncentrace FGF-1 jsou uvedeny ve výsledkové části. Koncentrace heparinu byla 10 µg/ml. Jaterní HSC byly získány z neparenchymové frakce jaterních buněk. Buňky byly sklizeny po 48 hodinách.

Linie HSC-T6 jsou imortalizované potkaní HSC. Linie byla laskavě poskytnuta Prof. Weiskirchenem (Institut für Molekulare Pathobiochemie, RWTH Universitätsklinikum Aachen, Německo). Kultivační podmínky jsou uvedeny v Peterová a spol. 2016. Část buněk byla rozsuspendována v 0,1% kolagenním gelu a část buněk byla kultivována na plastu. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za bez sérové a byl přidán TGF-β1 (1ng/ml, Peprotech) na 24 hodin. Poté byl přidán FGF-1 (4 ng/ml, Peprotech) a heparin (10 µg/ml) nebo FGF-1, heparin v kombinaci s TGF-β1 (1 ng/ml, Peprotech). Po 24 hodinách byly buňky sklizeny.

5.4. Příprava kolagenního gelu

Příprava kolagenního gelu je uvedena v Peterová a spol. 2016.

5.5. Izolace RNA

Izolace RNA je blíže popsána v Peterová a spol. 2016.

5.6. Reverzní transkripce a qPCR

K reverzní transkripci jsme použili kit High-Capacity cDNA Archive Kit s náhodnými primery (Applied Biosystems). Změny v expresi jednotlivých genů byly sledovány kvantitativním real-time PCR (qPCR). Pro kvantifikaci cDNA byla použita technologie qPCR se sondami a primery TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Expresе genů byla normalizována na 18S RNA

5.7. Western blot

Elektroforéza probíhala na gradientových gelech Novex NuPAGE4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen Life technologies) za neredukčních podmínek. Nanášky proteinu se pohybovaly v rozmezí 10 – 30 µg na jamku. Westernový přenos probíhal na 0,2 µm nitroceluloseovou membránu Hybond (GE Healthcare). Jako kontrola nanášky bylo použito barvení membrány Poceau S. Použité primární i sekundární protilátky jsou uvedeny v Peterová a spol. 2016. Detekce byla provedena luminolem (Santa-Cruz). Snímky byly naskenovány, kvantifikovány programem QUANTITY ONE 4.6 (Bio-Rad) a normalizovány na kontroly neovlivněných buněk.

5.8. Imunocytochemie

Buňky jsme imunocytochemicky obarvili na přítomnost stresových vláken α -SMA. Přesný postup je uveden v Peterová a spol. 2016.

5.9. Zymografie

Želatinovou zymografií jsme stanovili aktivitu MMP-2 a 9 secernovaných do média, Detailní postup je uveden v Peterová a spol. 2016.

5.10. ELISA

Hladiny extracelulárního TGF- β 1 byly stanoveny v médiu s použitím komerčních ELISA kitů (Invitrogen Life Technologies) podle instrukcí výrobce.

5.11. Stanovení DNA

Množství DNA jsme stanovili spektrofotometricky. Buňky byly lyzovány 5% kyselinou chloristou. K detekci jsme použili difenylamin a acetaldehyd. Celkové množství bylo normalizováno na počet buněk.

5.12. WST-1 test

Ke stanovení viability buněk jsme použili Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche). Proliferace byla stanovena spektrofotometricky a byla normalizována na počet vysazených buněk.

5.13. Statistická analýza

Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism (GraphPad Software version 6). K analýze byly použity neparametrický T-test a ANOVA.

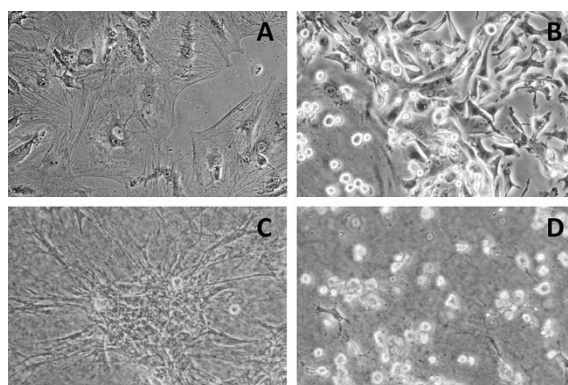
6. VÝSLEDKY

V první části této práce jsme sledovali vliv kultivačního prostředí a FGF-1/H na primokulturu jaterních MFB, které jsme získali z neparenchymové frakce jaterních buněk potkanů (kmen Sprague-Dawley). V druhé části jsme se zaměřili na vliv kultivačního prostředí, TGF- β 1 a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6.

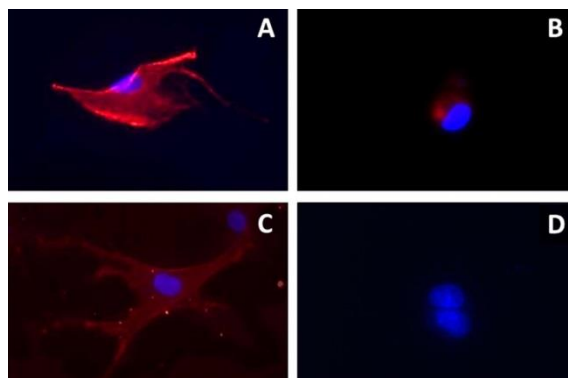
6.1. Vliv růstového faktoru fibroblastů FGF-1 na jaterní myofibroblasty *in vitro*

6.1.1. Morfologie buněk

Rozdíly mezi buňkami jsou patrné na jejich morfologii. Obr. č. 1 zobrazuje MFB 48 hodin po 4. pasáži kultivované na plastu (A) a kolagenním gelu (C) a HSC 48 hodin po izolaci kultivované na plastu (B) a kolagenním gelu (D). MFB kultivované na plastu mají velká těla s viditelnými stresovými vlákny, která jsou patrná po imunocytochemickém barvení na α -SMA (Obr. č. 2 A). Oproti tomu MFB kultivované v kolagenním gelu mají menší protáhlá těla s dlouhými cytoplazmatickými výběžky a mají tendenci se shlukovat. Kolagenní gel tlumí v MFB expresi α -SMA v MFB (Obr. č. 2 C). HSC kultivované na plastu mají dlaždicový tvar bez viditelných stresových vláken α -SMA (Obr. č. 2 B). HSC v kolagenním gelu netvoří shluky jako MFB. Mají malá kulatá těla bez cytoplazmatických výběžků (Obr. č. 1 D) a stresových vláken α -SMA (Obr. č. 2 D).



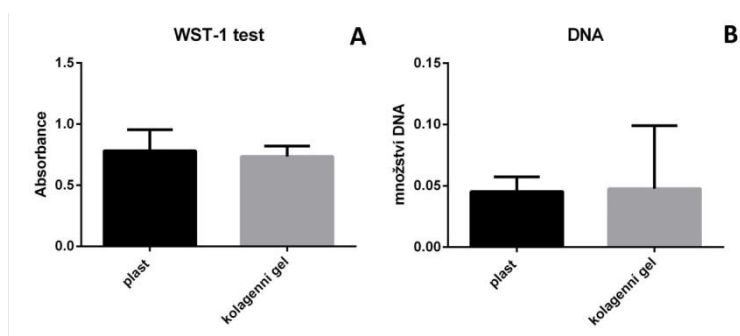
Obrázek č. 1 Jaterní MFB kultivované na plastu (A) a v kolagenním gelu (C) 48 hodin po vysazení. Jaterní HSC kultivované na plastu (B) a v kolagenním gelu (D) 48 hodin po vysazení, zvětšení 100x.



Obrázek č. 2 Imunocytochemické barvení α -SMA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (C) a HSC na plastu (B) a v kolagenním gelu (D) 48 hodin po vysazení, zvětšení 1000x.

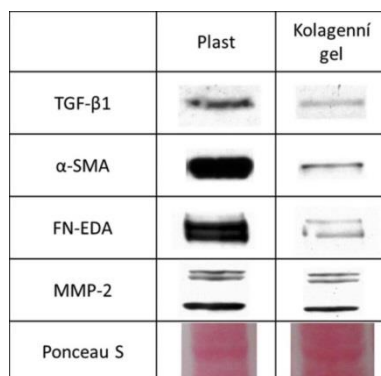
6.1.2. Vliv kultivačního prostředí na proliferaci MFB a expresi proteinů MFB fenotypu

Proliferaci na plastu i v kolagenním gelu jsme hodnotili WST-1 testem (graf č. 1A) a stanovením celkové DNA (graf č. 1B). Z grafů plyne, že kultivační prostředí nemá na proliferaci MFB vliv.



Graf č. 1: Vliv kultivačního prostředí na proliferaci buněk, WST-1 test (A) a stanovení DNA (B) n=4, p ≤ 0,05

Dále jsme sledovali expresi proteinů typických pro MFB (TGF- β 1, α -SMA, FN-EDA) a pro degradaci ECM (MMP-2). K analýze byla použita elektroforéza s westernovým přenosem. Kultivace MFB v kolagenním gelu byla provázena poklesem hladin sledovaných proteinů: TGF- β 1 (sníženo 6x), α -SMA (sníženo 3x) a FN-EDA (sníženo 2,5x). Exprese MMP-2 byla snížena jen mírně (Obr. č. 3). Ke kontrole nanášky bylo použito barvení membrány Ponceau S.

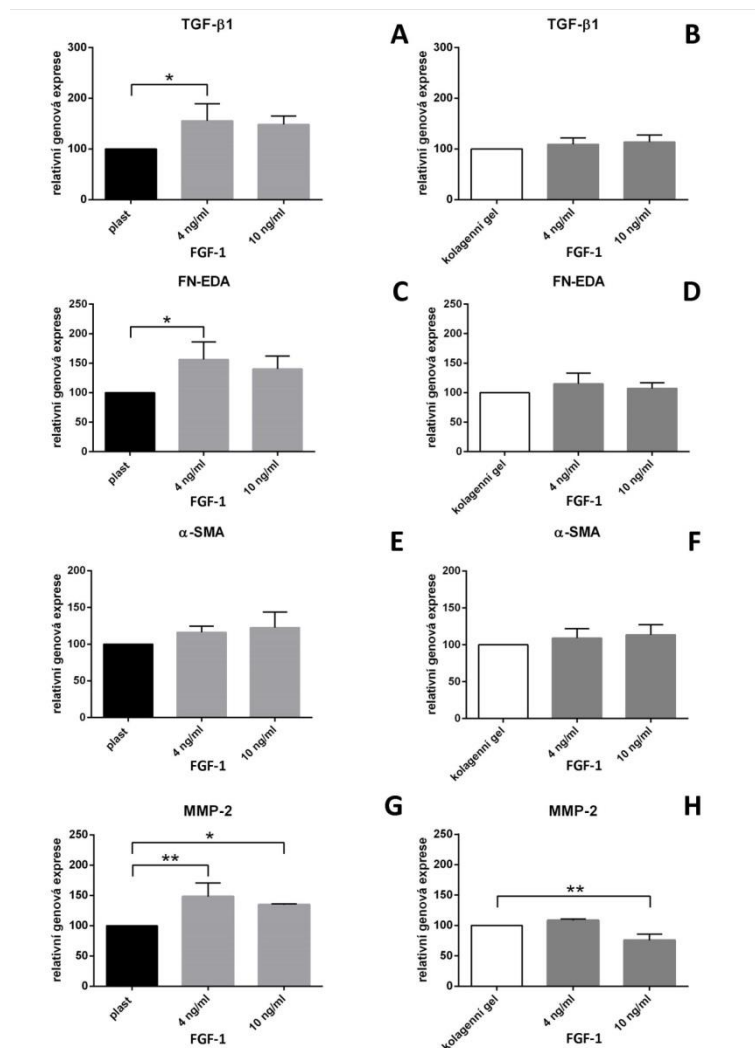


Obrázek č. 3: Vliv kultivačního prostředí na expresi markerů MFB – western blot

6.1.3. Koncentrační řada působení FGF-1

V naší práci jsme testovali samotný FGF-1 o koncentracích 4 a 10 ng/ml média s obsahem 0,5% séra (graf č.2). Sledovali jsme expresi genů typických pro MFB (TGF- β 1, α -SMA, FN-EDA) a pro degradaci ECM (MMP-2) na úrovni mRNA. Výsledky jsou uvedeny v relativních hodnotách, kdy jako 100 % je brána exprese v buňkách bez ovlivnění FGF-1.

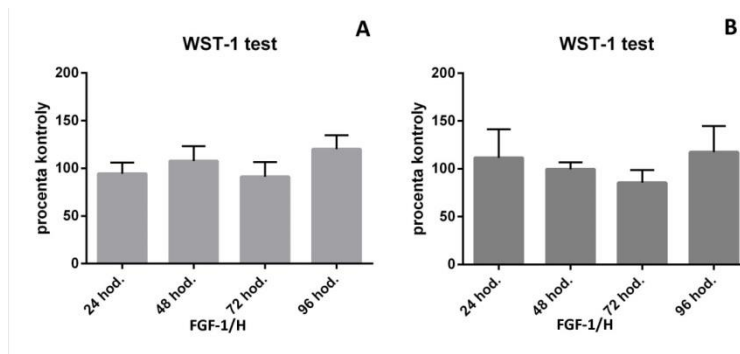
Z výsledků vyplývá, že nejnižší sledovaná koncentrace 4 ng/ml je účinná, při které dochází k indukci exprese TGF- β 1, FN-EDA a MMP-2. Během následujících experimentů jsme dle těchto výsledků používali FGF-1 (4 ng/ml).



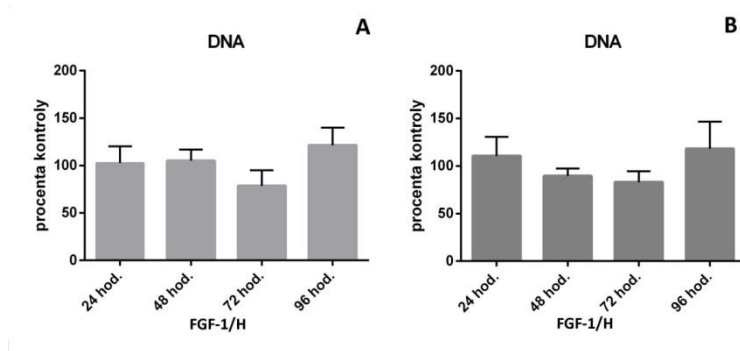
Graf č. 2: Koncentrační řada FGF-1 – genová exprese markerů MFB na plastu (A, C, E, G) a v kolagenním gelu (B, D, F, H), n=3, p \leq 0,05

6.1.4. Vliv FGF-1/H na proliferaci MFB

FGF-1 stejně jako ostatní růstové faktory může ovlivňovat proliferaci a diferenciaci buněk. Vliv na proliferaci jaterních MFB jsme sledovali v obou kulturačních prostředích pomocí WST-1 testu (graf č. 3) a stanovení množství DNA (graf č. 4). FGF-1/H bylo přidáno na časové intervaly v rozmezí 24-96 hodin. Výsledky jsou uvedeny v procentech neovlivněné kontroly v daném časovém intervalu kontroly. Z grafů plyne, že FGF-1/H na proliferaci jaterních MFB nemá vliv.



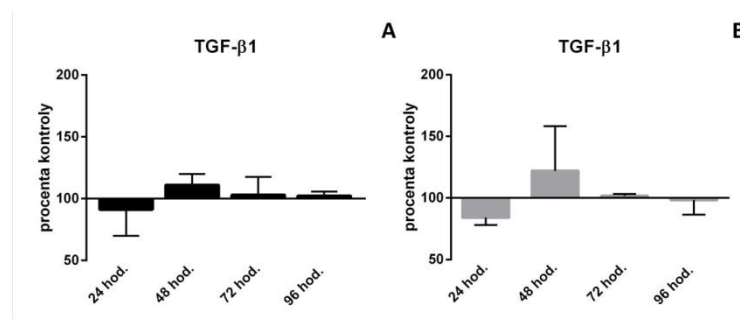
Graf č. 3: Vliv FGF-1/H na proliferaci buněk v čase na plastru (A) a v kolagenním gelu (B) – WST-1 test, n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 4: Vliv FGF-1/H na proliferaci buněk v čase na plastru (A) a v kolagenním gelu (B) – Stanovení DNA, n=3, p ≤ 0,05

6.1.5. Časová křivka působení FGF-1/H na expresi proteinů

Expres vybraných proteinů v MFB ovlivněných FGF-1/H po dobu 24, 48, 72 a 92 hodin je uvedena na grafech č. 5-8. Protein TGF-β1 byl westernovým přenosem nedetekovatelný, proto jsme ke stanovení extracelulární koncentrace použily metodu ELISA. Zjistili jsme, že hladiny TGF-β1 secernovaného do média se pod vlivem FGF-1/H významně nemění (graf č 5).

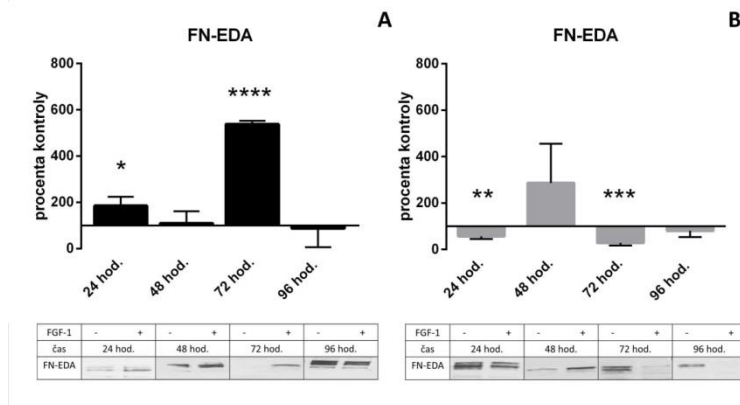


Graf č. 5: Vliv FGF-1/H v čase na sekreci extracelulárního TGF-β1 do média MFB na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

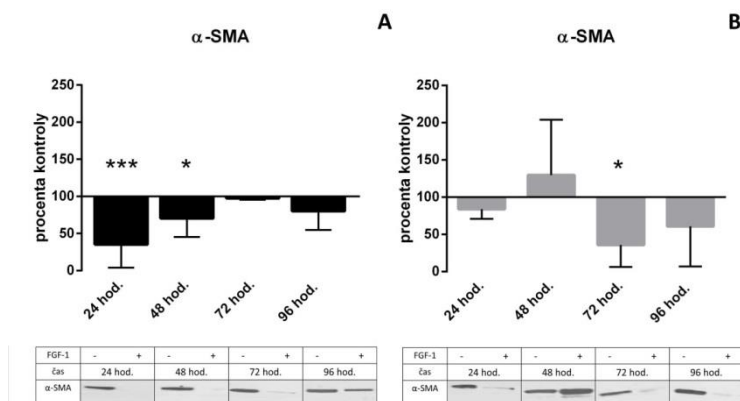
Proteiny α-SMA, FN-EDA a MMP-2 jsme stanovovali elektroforézou s westernovým přenosem a denzitometricky kvantifikovali. Výsledky jsou uvedeny v procentech kontroly v

daném časovém intervalu. Grafy jsou doplněny reprezentativní fotografií membrány. Doba expozice membrán z buněk na kolagenním gelu byla delší, z důvodu nižší exprese sledovaných proteinů. Porovnání exprese proteinů mezi buňkami na platu v kolagenním gelu jsou uvedeny v kapitole 6.1.2 obrázek č. 3.

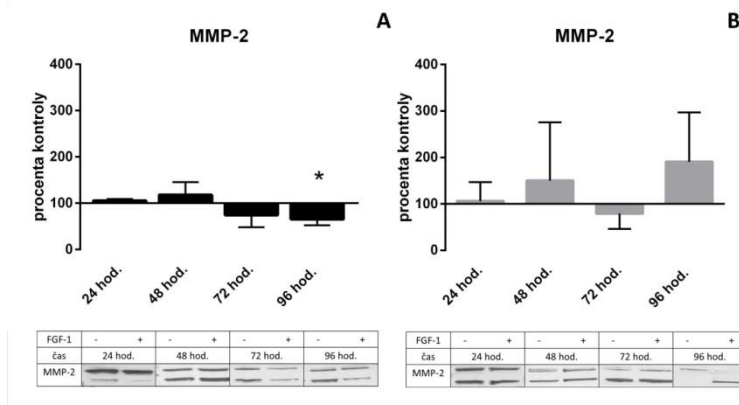
Z výsledků je patrné, že na platu FGF-1/H zvyšuje během prvních 72 hodin expresi FN-EDA (graf č. 6 A), ale expresi α -SMA snižuje (graf č. 7 A). V buňkách kultivovaných v kolagenním gelu exprese α -SMA (Graf č. 7 B) i FN-EDA (graf č. 6 B) mírně klesaly. Expresi MMP-2 byla pod vlivem FGF-1/H snížena jen v buňkách na platu po 96 hodinách (graf č. 9 A).



Graf č. 6: Vliv FGF-1/H v čase na expresi FN-EDA v MFB na platu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$



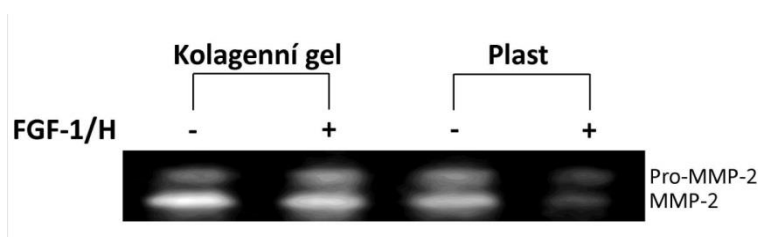
Graf č. 7: Vliv FGF-1/H v čase na expresi α -SMA v MFB na platu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$



Graf č. 8: Vliv FGF-1/H v čase na expresi α -SMA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$

6.1.6. Vliv FGF-1/H na aktivitu želatináz

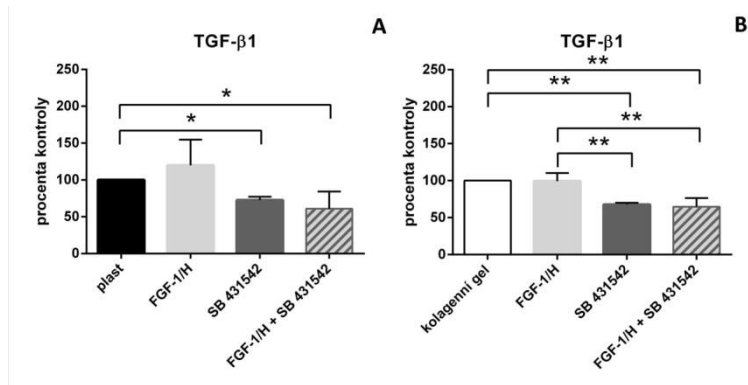
Aktivitu MMP-2, která byla secernována do média buňkami na plastu i v kolagenním gelu, jsme stanovili želatinovou zymografií. Na obrázku č. 10 je reprezentativní fotografie gelu, bílá místa odpovídají aktivitě MMP-2 a pro-MMP-2. Zpracování vzorků (denaturace a opětovná renaturace) umožňuje i inaktivním pro-MMP trávit želatinu. Přesazením buněk do kolagenního gelu aktivita vzrostla MMP-2. FGF-1/H však aktivitu tlumila v obou prostředích.



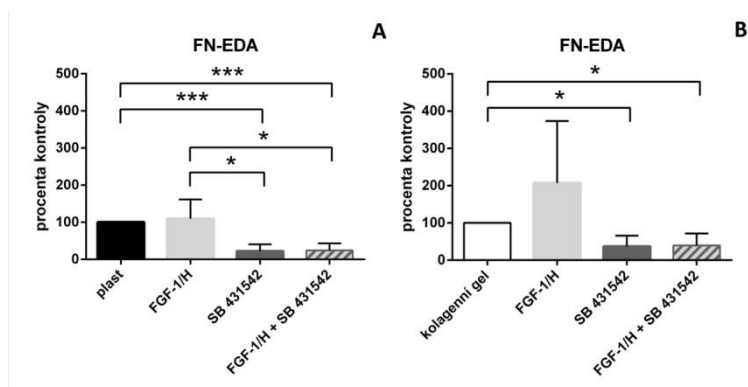
Obrázek č. 4: Aktivita MMP-2 secernované buňkami na plastu (C, D) a v kolagenním gelu (A, B) pod vlivem FGF-1/H (B, D)

6.1.7. Exprese proteinů po inhibici TGFR I

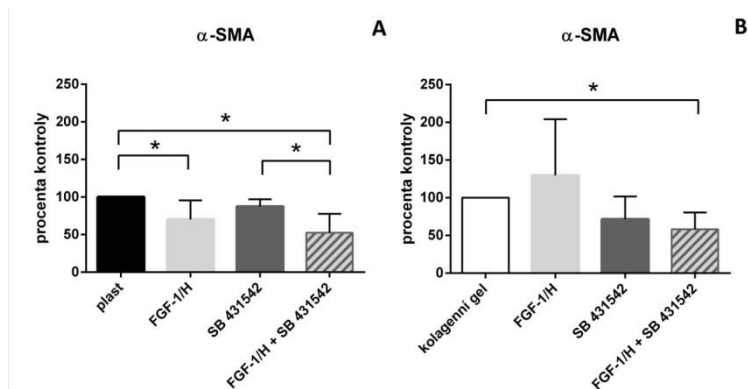
Dle našich zjištění MFB exprimují gen pro TGF- β 1. Ke zjištění možné účasti TGF- β 1 na stimulaci MFB fenotypu jsme receptor pro TGF- β 1 zablokovali inhibitorem SB 431542. FGF-1/H i inhibitor jsme přidávali na dobu 48 hodin. Proteiny α -SMA, FN-EDA a MMP-2 jsme stanovovali elektroforézou s westernovým přenosem a denzitometricky kvantifikovali. Extracelulární TGF- β 1 jsme stanovili metodou ELISA. Výsledky jsou uvedeny v procentech příslušné kontroly. Inhibice TGFR I významně snížila sekreci TGF- β 1 (graf č. 9 A, B) i expresi FN-EDA (graf č. 10 A, B) jak v buňkách na plastu tak v buňkách v kolagenním gelu. Exprese α -SMA byla inhibicí ovlivněna jen v kombinaci s FGF-1/H (graf č. 11 A, B). Exprese MMP-2 nebyla významně ovlivněna (graf č. 12).



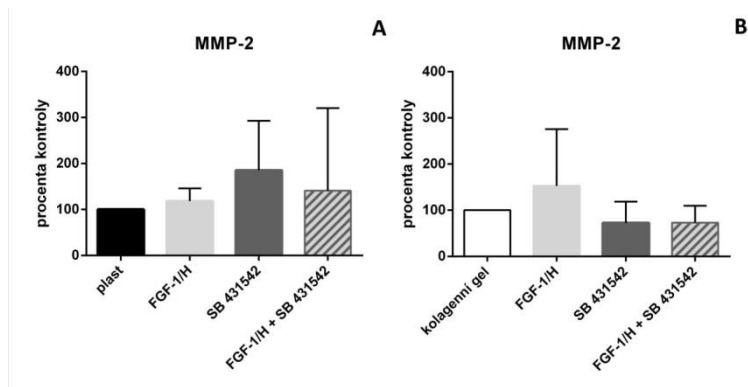
Graf č. 9: Vliv inhibice TGFR I na sekreci TGF-β1 do média buňkami na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 10: Vliv inhibice TGFR I na expresi FN-EDA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

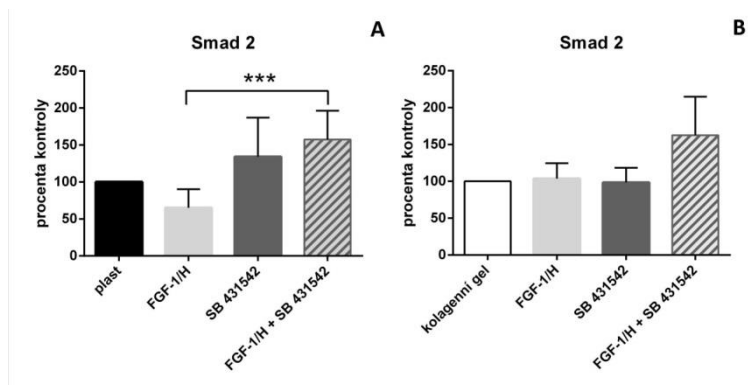


Graf č. 11: Vliv inhibice TGFR I na expresi α-SMA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

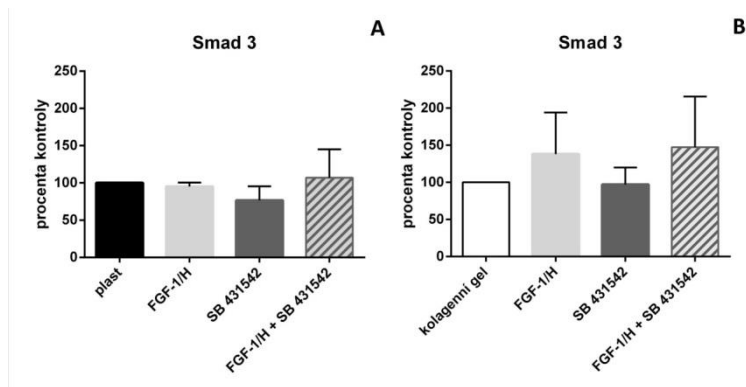


Graf č. 12: Vliv inhibice TGFR I na expresi MMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$

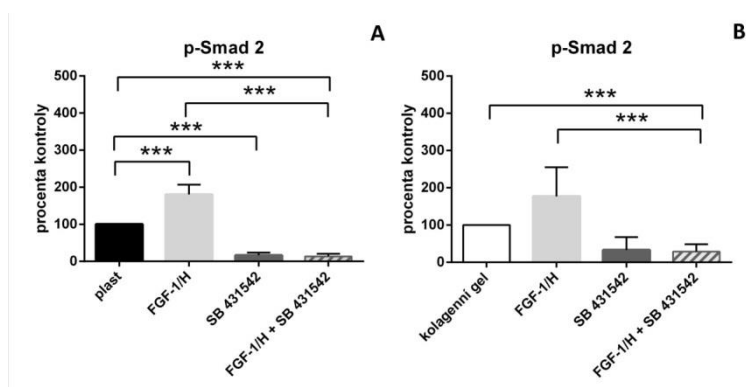
Mechanismy působení TGF- β 1 i FGF-1 jsou zprostředkovány různými signálními drahami. Jednou z možností je působení přes proteiny Smad. Proto jsme sledovali účinek FGF-1/H a inhibitoru SB 431542 na jejich fosforylaci. SB 431542 sice nemá vliv na množství Smad 2 (graf č. 16) a Smad 3 (graf č. 17), ale v buňkách na plastu snižuje jejich fosforylaci (graf č. 18 A, 19 A). V buňkách v kolagenním gelu fosforylace klesá až po kombinaci inhibitoru s FGF-1/H (graf č. 18 B, 19 B). FGF-1/H má v různých prostředích odlišné účinky. V MFB na plastu zvyšuje fosforylaci Smad 2, ale v buňkách v kolagenním gelu snižuje fosforylaci Smad 3.



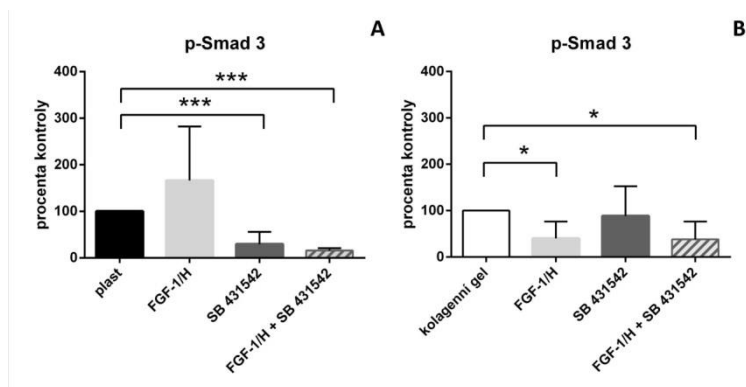
Graf č. 13: Vliv inhibice TGFR I na expresi Smad 2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$



Graf č. 14: Vliv inhibice TGFR I na expresi Smad 3 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 15: Vliv inhibice TGFR I na expresi p-Smad 2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

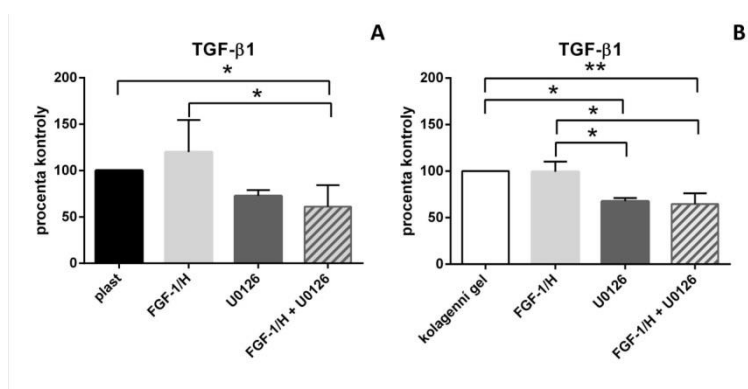


Graf č. 16: Vliv inhibice TGFR I na expresi p-Smad 3 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

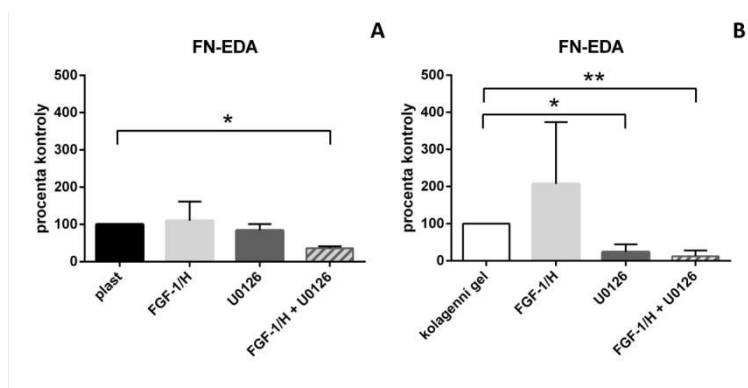
6.1.8. Expres proteinů po inhibici signální dráhy MEK/ERK

Při studiu signálních drah FGF-1/H jsme pomocí inhibitoru U0126 zablokovali signální dráhu MEK/ERK. Inhibitor mírně tlumil sekreci TGF-β1 v buňkách v kolagenním gelu (graf č. 17 B) a v kombinaci s FGF-1/H i v buňkách na plastu (graf č. 17 A). Stejně účinky měla inhibice na expresi FN-EDA (graf č. 19 A, B). K mírnému poklesu hladiny α-SMA došlo při kombinaci inhibitoru a FGF-1/H v buňkách na plastu, ale v buňkách

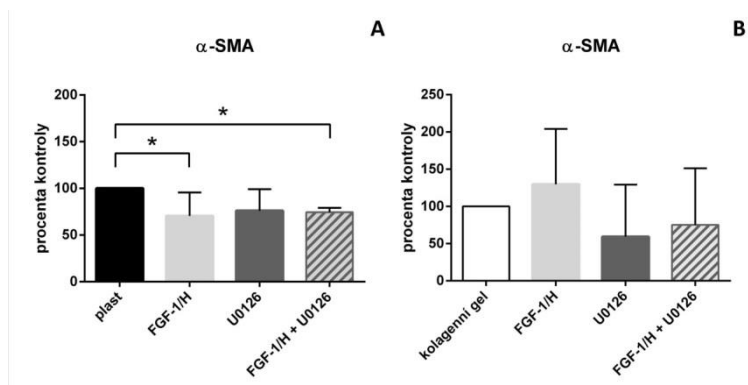
v kolagenním gelu tento efekt nenastal (graf č. 19 A, B). Na expresi MMP-2 nebyla inhibitory významně ovlivněna (graf č. 20 A, B).



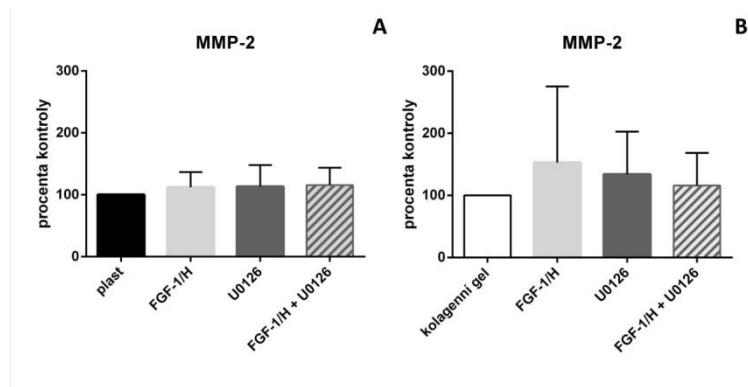
Graf č. 17: Vliv inhibice MEK/Erk na sekreci TGF-β1 v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 18: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi FN-EDA v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 19: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi α-SMA v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05



Graf č. 20: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi MMP-2 v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05

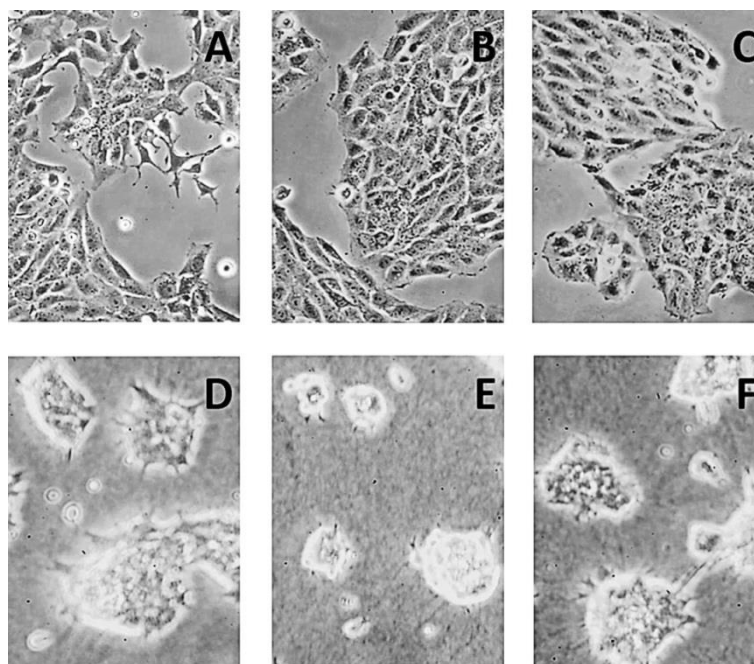
6.2. Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6

V druhé části jsme pracovali s buněčnou linií HSC-T6, kterou nám laskavě poskytl prof. Weiskirchen (Institut für Molekulare Pathobiochemie, RWTH Universitätsklinikum Aachen, Germany). HSC-T6 je imortalizovaná buněčná linie vykazující typické znaky aktivovaných HSC. Opět jsme porovnávali buňky kultivované v 2D prostředí na plastru s buňkami v 3D prostředí kolagenního gelu. HSC-T6 jsme nejprve stimulovali cytokinem TGF-β1. Poté jsme studovali vliv FGF-1 na návrat aktivovaných HSC zpět do klidového stavu.

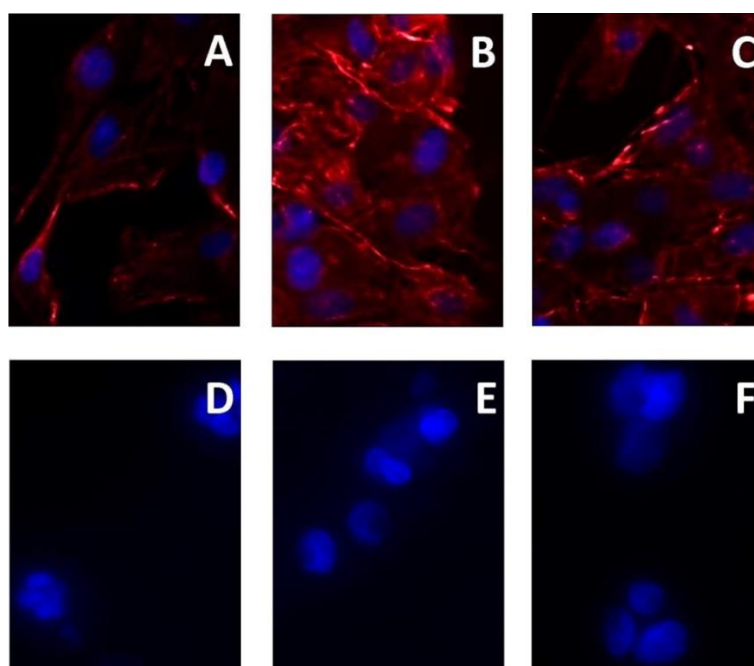
6.2.1. Morfologie buněk

Buňky kultivované na plastru samotné či s přidávkou cytokinů nevykazují žádné morfologické změny (obr. č. 5 A, B, C). Mají dlaždicový tvar bez viditelných stresových vláken. Stresová vlákna jsou však patrná po imunocytochemickém barvení α-SMA. Kontrolní buňky jsou na α-SMA pozitivní, z čehož plyne, že se skutečně jedná o aktivované HSC (obr. č. 6 A). Po stimulaci buněk TGF-β1 dochází k zesílení exprese α-SMA (obr. č. 6 B) avšak FGF-1/H stimulaci vyvolanou TGF-β1 snižuje jen mírně (obr. č. 6 C).

Oproti tomu buňky kultivované v kolagenním gelu tvoří výrazné shluky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky (obr. č. 5 D). Po přidání TGF-β1 se shluky zmenšují a cytoplazmatické výběžky zkracují (11 E). FGF-1 potlačuje morfologické změny vyvolané TGF-β1 (11 F). Expresí stresových vláken pozitivních na α-SMA je zcela potlačena vlivem kolagenního gelu (obr. č. 6 D, E, F).



Obrázek č. 5: Morfologie HSC-T6 kultivovaných na plastu (A, B, C) a v kolagenním gelu (D, E, F) s přidavkem TGF- β 1 (B, C) nebo TGF- β 1 v kombinaci s FGF-1/H (C, F) po 72 hodinách od vysazení, zvětšeno 100 x



Obrázek č. 6: Imunocytochemické barvení α -SMA v HSC-T6 kultivovaných na plastu (A, B, C) a v kolagenním gelu (D, E, F) s přidavkem TGF- β 1 (B, E) nebo TGF- β 1 v kombinaci s FGF-1/H (C, F) po 72 hodinách od vysazení, zvětšeno 1000 x

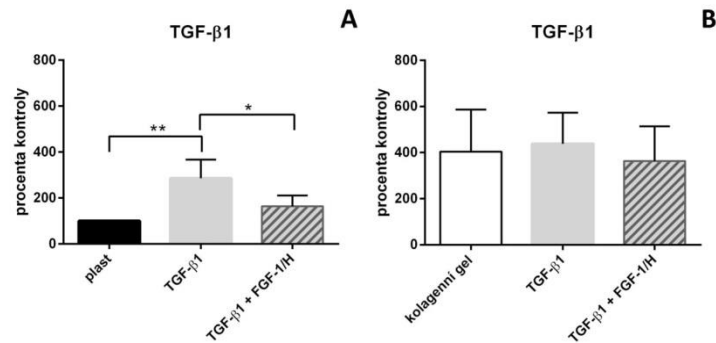
6.2.2. Vliv TGF- β 1 na expresi mRNA markerů MFB fenotypu

Pomocí qPCR jsme stanovili expresi mRNA TGF- β 1, FN-EDA, α -SMA a kolageny typu 1 α 2 a 1 α 4. Buňky byly kultivovány na plastu nebo v kolagenním gelu, samotné nebo

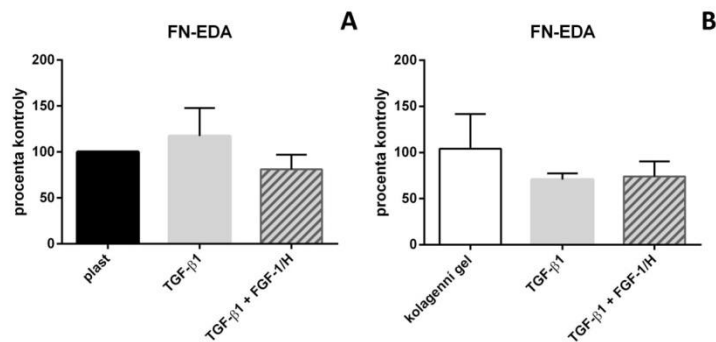
s přidavkem výše uvedených růstových faktorů. Výsledky jsou uvedeny v procentech kontrolních buněk na plastru.

Stimulace HSC-T6 na plastru růstovým faktorem TGF- β 1 měla za následek autoindukci mRNA TGF- β 1 (graf č. 21 A) a zvýšení exprese α -SMA (graf č. 23 A). Na expresi FN-EDA (graf č. 22 A) a obou typů kolagenu (graf č. 27 A, 28 A) nemělo přidání TGF- β 1 k buněčné kultuře žádný vliv. Přídavek FGF-1/H měl vliv pouze na mRNA TGF- β 1 (graf č. 21 A), kdy snížil expresi na hladinu kontrolních buněk.

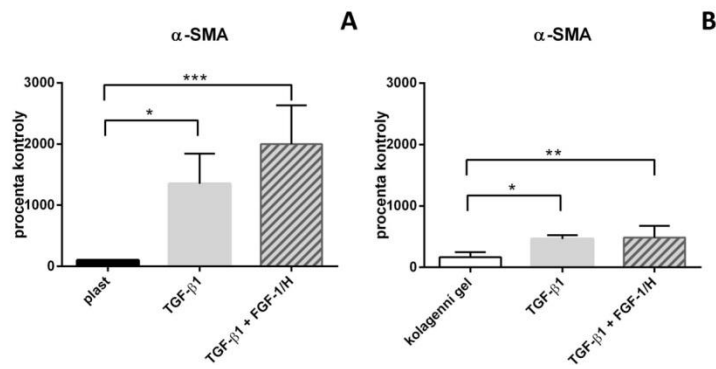
Buňky v kolagenním gelu reagovaly na TGF- β 1 pouze zvýšenou expresí α -SMA (graf č. 23 B). Na rozdíl od buněk na plastru zde nedocházelo k parakrinní stimulaci exprese TGF- β 1 (graf č. 21 B). Shodně s buňkami na plastru jsme nepozorovali žádnou indukci kolagenu (graf č. 24 B, 25 B) nebo FN-EDA (graf č. 22 B).



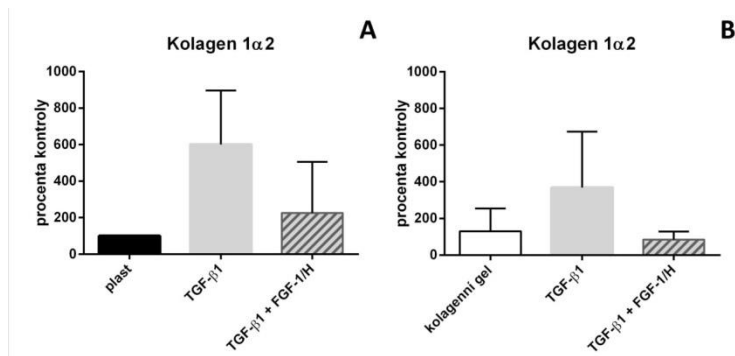
Graf č. 21: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na autoindukci mRNA TGF- β 1 v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p \leq 0,05



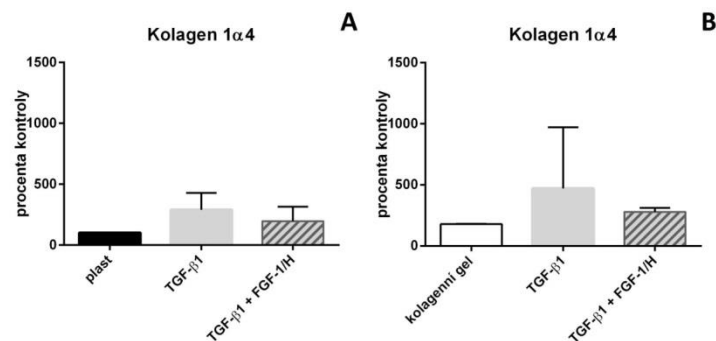
Graf č. 22: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA FN-EDA v buňkách na plastru (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p \leq 0,05



Graf č. 23: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA α-SMA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05



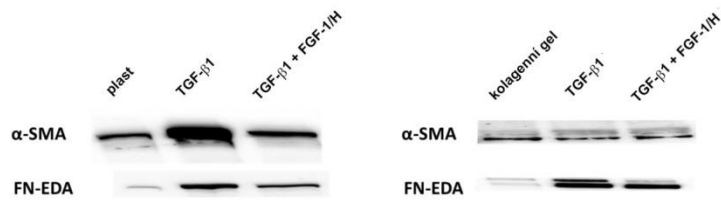
Graf č. 24: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA kolagenu 1α2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05



Graf č. 25: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA kolagenu 1α4 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05

6.2.3. Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi markerů MFB fenotypu

Expresi mRNA jsme ověřovali na úrovni bílkovin. Elektroforézou s westernovým přenosem jsme stanovili množství FN-EDA a α-SMA (obr. č. 7). TGF-β1 v obou prostředích indukoval expresi FN-EDA a FGF-1/H tuto stimulaci částečně potlačil, i když hladiny FN-EDA neklesly na úroveň v kontrolních buňkách. Podobné účinky měly oba cytokiny i na expresi α-SMA v buňkách na plastu. Kolagenní gel vliv TGF-β1 na expresi α-SMA zcela potlačil.

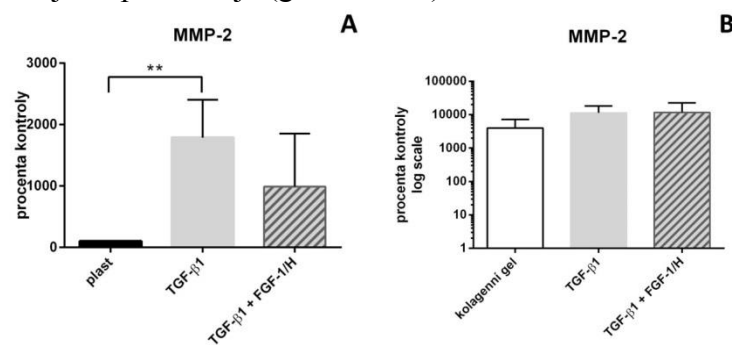


Obrázek č. 7: Western blot α -SMA a FN-EDA v HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu

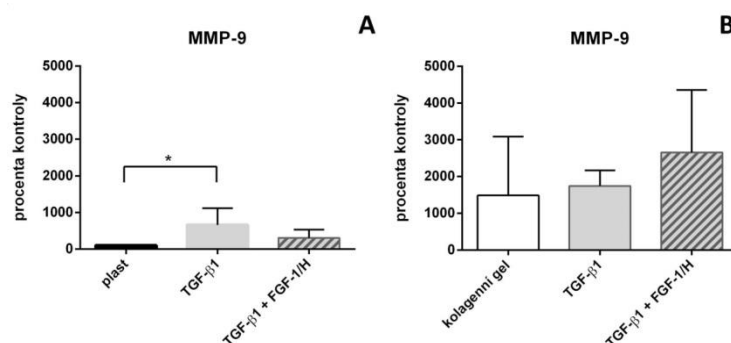
6.2.4. Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na proteolytickou aktivitu

Remodelace ECM je závislá na rovnováze mezi MMP a jejich inhibitory. Testovali jsme vliv cytokinů na regulaci želatináz MMP-2 a MMP-9 a membránově vázané MMP-14 a inhibitorů TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-3. Z grafů plyne, že v buňkách kultivovaných na plastu TGF- β 1 zvyšuje expresi mRNA MMP-2 (graf č. 29 A) a MMP-9 (graf č. 30 A), ale expresi mRNA MMP-14 neovlivňuje (graf č. 31 A). FGF-1/H nemá na mRNA stanovovaných MMP žádný vliv (grafy č. 29, 30, 31). V buňkách v kolagenním gelu je vliv TGF- β 1 i FGF-1/H zcela potlačen kultivačním prostředím (grafy č. 29 B, 30 B, 31 B).

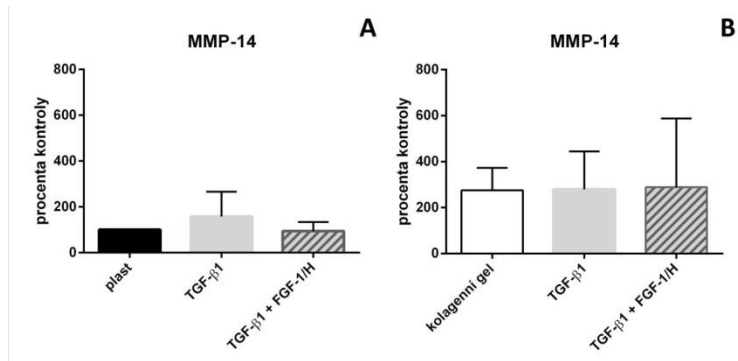
Expresie mRNA TIMP jsou též ovlivněné cytokiny pouze v buňkách na plastu (grafy č. 32, 33, 34). TIMP-1 je vlivem TGF- β 1 zvýšen. FGF-1/H efekt TGF- β 1 na expresi mRNA TIMP-1 částečně tlumí (graf č. 32 A). Naproti tomu TIMP-2 pod vlivem TGF- β 1 klesá a FGF-1/H tento efekt ještě prohlubuje (graf č. 33 A).



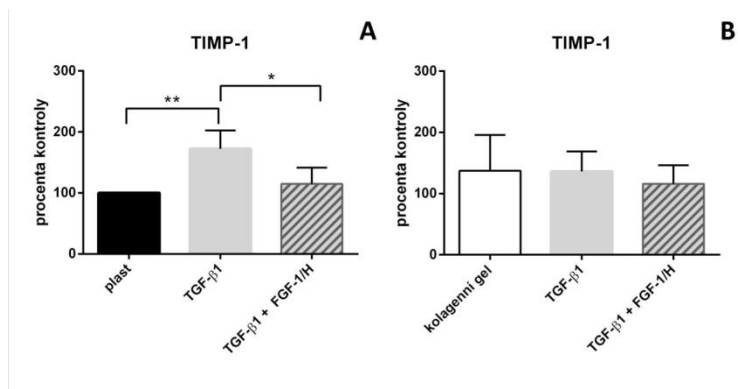
Graf č. 26: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), $n=4$, $p \leq 0,05$



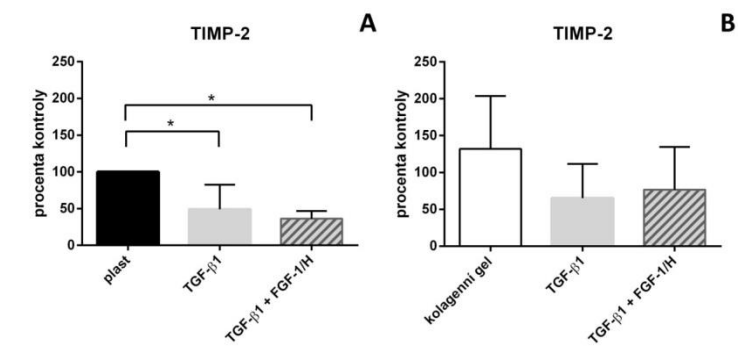
Graf č. 27: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-9 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), $n=4$, $p \leq 0,05$



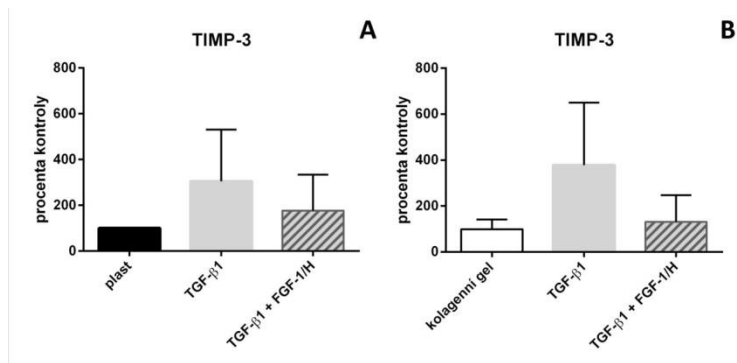
Graf č. 28: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-14 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p \leq 0,05



Graf č. 29: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-1 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p \leq 0,05

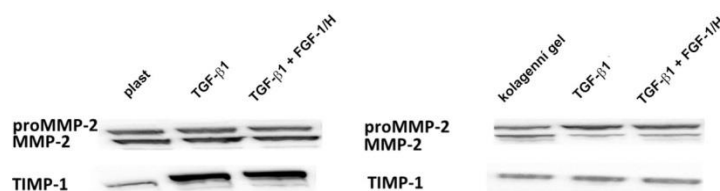


Graf č. 30: Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p \leq 0,05



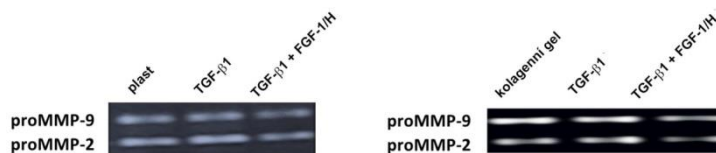
Graf č. 31: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-3 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05

Na úrovni bílkovin jsme stanovovali množství MMP-2 a TIMP-1. V buňkách na plastu nedocházelo pod vlivem TGF-β1 ani FGF-1 k žádným změnám exprese MMP-2, ale TIMP-1 je vlivem TGF-β1 zvýšen. Oproti tomu v buňkách v kolagenním gelu TGF-β1 snižuje expresi aktivní MMP-2 a exprese TIMP-1 se nemění.



Obrázek č. 8: Western blot MMP-2 a TIMP-1 v HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu

Proteolytickou aktivitu MMP-2 a MMP-9 secernovaných do média jsme stanovovali želatinovou zymografií (obr. č. 15). Zpracování vzorků (denaturace a opětovná renaturace) umožňuje normálně inaktivním pro-MMP trávit želatinu. Proteolytická aktivita v tomto případě odpovídá latentním formám enzymů. Buňky kultivované na kolagenním gelu secernovaly větší množství pro-MMP-2 i pro-MMP-9. TGF-β1 v kombinaci s FGF-1/H snižovali jejich množství v obou prostředích.



Obrázek č. 9: Želatinová zymografie MMP-2 a MMP-9 secernovaných HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu

7. DISKUZE

Klíčové buňky jaterní fibrózy jsou HSC a MFB. V neporušených játrech HSC ukládají triacylglyceroly a retinoidy, ale po poškození jater tuto vlastnost ztrácejí a jsou aktivovány, roste jejich kontraktilita, mění se fenotyp a tyto buňky poté nazýváme MFB. V první části této práce jsme sledovali vliv kultivačního prostředí a FGF-1/H na primokulturu jaterních MFB, které jsme získali opakovaným pasážováním neparenchymové frakce jaterních buněk bohaté na HSC. V druhé části práce jsme se zaměřili na vliv kultivačního prostředí a cytokinů TGF- β 1 a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6, která představuje časně aktivované HSC.

7.1. Vliv FGF-1/H na jaterní MFB *in vitro*

TGF- β 1, hlavní profibrogenní cytokin, je uvolňován z nekrotických buněk během poškození jater (Braunersreuther a spol., 2012). Je nezbytný pro přeměnu fibroblastů na myofibroblasty. Indukuje expresi markerů MFB fenotypu jako jsou α -SMA, kolagen a fibronektin (Kim a Ballock 2014). Buněčný FN existuje ve dvou variantách a to EDA a EDB. TGF- β 1 zvyšuje hromadění FN-EDA izoformy (Muro a spol., 2008, Serini a spol., 1998). Profibrogenní účinky TGF- β 1 jsou ještě zesíleny jeho schopností parakrinně i autokrinně stimulovat svojí vlastní expresi (Wen et al. 2003). Hladina TGF- β 1 v buňkách je závislá na tuhosti prostředí (Vaughan a spol., 2000), což potvrzují i naše výsledky. Kolagenní gel klade MFB menší odpor než plastové misky, proto přesazení MFB do kolagenního gelu má za následek mnohonásobné snížení exprese TGF- β 1, pod jehož vlivem klesají i množství FN-EDA a α -SMA. Dlouhodobá kultivace na plastu vedla v našich experimentech ke zvýšené syntéze TGF- β 1, který je jedním z hlavních cytokinů indukujících přeměnu původně klidových HSC na MFB. Za markery odlišující MFB od klidových HSC jsou považovány α -SMA a fibulin 2 (Knittel a spol., 1999). A naopak klidové HSC jsou pozitivní na reelin a desmin (Mermall a spol., 1998). Pro ověření MFB fenotypu jsme opakovaně pasážované buňky porovnávaly s klidovými HSC. Rozdíly mezi buňkami byly patrné již z jejich morfologie. Opakovaně pasážované buňky byly pozitivní na stresová vlákna obsahující α -SMA. Na základě stanovení α -SMA, fibulinu 2, reelinu a desminu jsme došli k závěru, že buňky po čtyřech pasážích mají zcela MFB fenotyp. Přesazení těchto buněk do kolagenního gelu jejich fenotyp tlumí, ale stále se jedná o MFB.

Při kultivaci na plastových miskách se mrtvé buňky uvolňují z podkladu do média a před sklizením buněk jsou odstraněny. Z kolagenního gelu se odumřelé buňky uvolňovat do média nemohou a masivní apoptóza by mohla ovlivňovat budoucí stanovení. Z tohoto důvodu jsme považovali za nutné stanovit viabilitu a proliferaci buněk. Je známo, že proliferace plicních fibroblastů je kolagenním gelem snížena (Mio a spol., 1996). Z našich výsledků však plyne, že viabilita ani proliferace jaterních MFB se pod vlivem kultivačního prostředí nemění.

TGF- β 1 indukuje přeměnu fibroblastů na MFB epitelo-mezenchymální tranzicí (EMT). A i když molekulární mechanismy, kterými se řídí TGF- β 1 vyvolaná EMT, nejsou zcela objasněny, většina experimentů naznačuje, že je zprostředkována především Smad signální dráhou (Ramos a spol., 2010). TGF- β 1 působí na buňky především Smad zprostředkovanou signalizací, i když jsou známy i na Smad nezávislé signální dráhy jako jsou MEK/ERK, p38, PI3 a JNK (Attisano a Wrana, 2002). Kim a kolektiv prokázali, že autoindukce TGF- β 1 je zprostředkována právě JNK signální dráhou (Kim a spol., 1990). Tvrzení Ramose a kolektivu, že TGF- β 1 indukuje změny v expresi prostřednictvím proteinů Smad (Ramos a spol. 2010), se potvrdila i v jaterních MFB v našich experimentech. Po zablokování receptoru TGFR I pomocí inhibitoru SB 431552 došlo k poklesu exprese fosforylovaných forem Smad 2 i 3.

Růstové faktory FGF byly původně izolovány z hypofýzy skotu jako mitogeny, které by mohly stimulovat růst a proliferaci buněk. FGF-1 je významným mitogenem pro

hepatocyty (Tanahashi a spol., 1994), ale jeho vliv na proliferaci jaterních MFB nebyl dosud zdokumentován. Z našich výsledků vyplývá, že na rozdíl od hepatocytů FGF-1 nepůsobí na MFB jako mitogen. Proliferace buněk se během časového intervalu 24 až 96 hodin nezměnila. FGF-1 v kombinaci s heparinem má antifibrogenní účinky na plicní fibroblasty (Ramos a spol., 2006), kde snižuje expresi kolagenu typu I a zvyšuje expresi kolagenáz (Becerril a spol., 1999). V myofibroblastech oční rohovky inhibuje expresi α -SMA (Maltseva a spol., 2001). Koncentrace FGF-1 použité při pokusech in vitro se podle dostupné literatury pohybují od 1 do 80 ng/ml. Z našich výsledků je patrné, že účinná koncentrace FGF-1 je již 4 ng/ml.

Bylo prokázáno že FGF-1/H je schopen eliminovat účinky TGF- β 1 prostřednictvím MEK/ERK kinázy, což má za následek fosforylaci ERK-1 a defosforylaci Smad 2 (Ramos a spol., 2010, Shimbori a spol., 2016). Naše experimenty dokázaly, že FGF-1 zvyšuje expresi fosforylovaného Smad 2.

Při našich experimentech se hladina secernovaného TGF- β 1 do média pod vlivem FGF-1 nezměnila ani v delším časovém intervalu, což potvrzuje výsledky Kim a kolektivu i Ramose a kolektivu (Kim a spol., 1990, Ramos a spol., 2010). Inhibitor TGFR I v našich experimentech snížil koncentraci TGF- β 1 v médiu na plastu i v kolagenním gelu. Sekrece extracelulárního TGF- β 1 však byla snížena i při použití inhibitoru MEK/ERK signální dráhy U0126 kombinaci s FGF-1/H. Z čehož vyplývá, že indukce TGF- β 1 i působení FGF-1/H na ni, je závislá na více extracelulárních signálech s přesahy do jiných signálních drah.

V lidských ledvinných buňkách TGF- β 1 aktivuje PI3 signální dráhu, čímž reguluje alternativní sestřih FN pre-mRNA a dochází ke zvýhodnění EDA izofomy (Phanish a spol., 2015). V našich experimentech MFB kultivované na plastu reagovaly na FGF-1/H nárůstem exprese FN-EDA a poklesem exprese v MFB v kolagenním gelu. Hladiny poklesly i po použití inhibitorů SB 431542 a U0126, které inhibují jiné signální dráhy než je PI3. To naznačuje, že exprese FN-EDA během našich experimentů nebyla regulována pouze TGF- β 1.

TGF- β 1 indukuje nejprve expresi FN-EDA a poté společně stimulují expresi α -SMA (Serini a spol., 1998). Při našich experimentech měl přírůstek FGF-1/H k MFB za následek pokles exprese α -SMA v obou prostředích. Což je v souladu s prací Maltsevy a kolektivu o účinku FGF-1/H na MFB oční rohovky (Maltseva a spol., 2001). Změny na úrovni FN-EDA během našich pokusů nekorelovaly se změnami v expresi α -SMA. Hladina α -SMA byla ovlivněna především kultivačním prostředím a až poté inhibitory signálních drah. Kultivace v kolagenním gelu hrála ve snížení množství α -SMA klíčovou roli. Což potvrzuje výsledky Arory a kolektivu, že exprese α -SMA je závislá především na tuhosti prostředí (Arora a spol., 1999).

Porušení rovnováhy mezi degradací a syntézou složek ECM je klíčovým faktorem při vzniku jaterní fibrózy. Degradace ECM je způsobena aktivitou matrix metaloproteáz. MMP jsou regulovány na několika různých úrovních, například expresí genů, aktivací proenzymu nebo inhibicí specifickými inhibitory (Birkedal-Hansen a spol., 1993). TGF- β 1 reguluje expresi MMP v mnoha buňkách, vyvolává transkripci MMP-2 a zvyšuje její aktivitu v lidských vazivových fibroblastech (Xie a spol. 2013). FGF-1/H v lidských plicních fibroblastech nevyvolává žádné změny v expresi MMP-2 na úrovni genů ani v její aktivitě (Becerril a spol., 1999). Z našich výsledků vyplývá, že v souladu s efektem FGF-1/H na plicní fibroblasty, množství MMP-2 v MFB není ovlivněno. Experimenty s inhibitorem TGFR I však prokázaly, že TGF- β 1 nemá na indukci syntézy MMP-2 žádný vliv, což nesouhlasí s tvrzením Xie a kolektivu. Nicméně přesazení buněk do kolagenního gelu zvýšilo aktivitu MMP-2. FGF-1/H aktivitu MMP-2 tlumila v obou kultivačních prostředích. Tento výsledek je v rozporu s výsledky Becerril a kolektivu.

Z naší práce vyplývá, že FGF-1/H má za určitých podmínek antifibrotické účinky na jaterní MFB. Kolagenní gel uklidňuje MFB fenotyp

a moduluje účinky FGF-1/H, pravděpodobně skrze integriny zprostředkované zásahy do signální dráhy FGF-1/H.

7.2. Vliv TGF- β 1 a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6

V druhé části práce jsme se věnovali buněčné linii HSC-T6. Jako HSC-T6 se označuje jeden z klonů izolovaných doktorem Friedmanem, který představuje dobře zavedený model aktivovaných HSC (Gressner a Weiskirchen 2006).

Aktivaci HSC-T6 jsme zesílili přidávkem TGF- β 1, což je dobře patrné po obarvení stresových vláken α -SMA v buňkách na plastu. Kolagenní gel stejně jako v MFB expresi α -SMA potlačil. Naše výsledky ukázaly, že TGF- β 1 v HSC-T6 na plastu vyvolává expresi vlastní mRNA, což potvrzuje práci Kim a kolektivu o autoregulaci TGF- β 1 (Kim a spol., 1990). Dále indukoval expresi α -SMA, ale na expresi mRNA prokolagenu 1 α 2 ani 1 α 4 neměl vliv. Zvýšení exprese FN-EDA vlivem TGF- β 1, popsané v pracích Muro a kolektiv nebo Serini a kolektiv (Muro a spol., 2008, Serini a spol., 1998), bylo při našich experimentech v HSC-T6 detekováno až na úrovni proteinů.

Interakce mezi buňkami a ECM mění jejich fenotyp. Opětovně jsme k napodobení in vivo podmínek použili kolagenní gely. Bylo publikováno několik studií, kde TGF- β 1 stimuluje kontrakci nativních kolagenních gelů tím, že indukuje expresi α -SMA v HSC (Kharbanka a spol., 2004). Arora ve své práci uvádí, že TGF- β 1-indukovaný nárůst α -SMA v gingiválních fibroblastech je závislý na rigiditě kultivačního prostředí (Arora a spol., 1999). Interakce kolagenních vláken s integrinem α 2 β 1 může být dle našeho názoru omezujícím faktorem v regulaci FN-EDA a α -SMA. Z našich výsledků plyne, že TGF- β 1 nedokáže indukovat expresi α -SMA v kolagenním gelu. Exprese FN-EDA není závislá na rigiditě prostředí a TGF- β 1 indukuje jeho expresi.

Naše výsledky ukazují, že prostřednictvím FGF-1/H může docházet ke snížení MFB diferenciaci, ale mechanismus není založen pouze na down-regulaci exprese genů. FGF-1/H snížil TGF- β 1 autoindukci, ale také stimuloval expresi mRNA α -SMA. Na úrovni proteinů snížil FGF-1/H v buňkách na plastu hladiny FN-EDA i α -SMA. Naše výsledky odpovídají předchozím studiím, kdy FGF-1/H obrátil MFB fenotyp v plicních fibroblastech (Ramos a spol., 2006). Plicní fibroblasty vykazovaly sníženou tvorbu kolagenu a α -SMA. Na rozdíl od buněk v kolagenním gelu, v buňkách na plastu je zvýšená exprese α -SMA doprovázená zvýšenou expresí FN-EDA, v čemž se shodujeme s jinými studiemi (Wu a spol., 2014 Jarnagin a spol., 1994). Celkově vzato, HSC-T6 jsou buňky, které pokud jsou stimulovány, jsou schopny exprimovat některé (ale ne všechny) profibrogenní markery. Exprese mohou být modulovány trojrozměrným prostředím. FGF-1/H může snížit některé z těchto změn.

Proteolýza ECM je klíčovým faktorem při progresi jaterní fibrózy. Je zprostředkována MMP a jejich inhibitory. Zvýšení obratu ECM je cílem anti-fibrotické terapie. Během akutního poškození jater pod vlivem cytokinů a růstových faktorů, včetně TGF- β 1, rostou hladiny MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 (Knittel a spol., 1999), což naznačuje jejich roli při remodelaci jaterní tkáně. MMP-9 byla nalezena v jizvě spolu s aktivovanými HSC (Han a spol., 2006). V našich experimentech stimulace buněk TGF- β 1 podporuje expresi mRNA MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 a snižuje expresi mRNA TIMP-2, ale na úrovni proteinů nebyly žádné změny patrné. FGF-1/H mírně potlačil sekreci MMP-2 a MMP-9 secernovaných do média. FGF-1/H snižuje expresi mRNA TIMP-1. TIMP-1 je důležitý pro inhibici MMP-9, zatímco TIMP-2 reguluje aktivitu MMP-2 (Seo a spol., 2003). Předchozí studie ukázaly, že 3D prostředí bohaté na kolagen typu I stimuluje remodelaci ECM, indukci MMP-9 v HSC (Knittel 1999, Takahara 2004). To je v souladu s našimi výsledky, kde kolagenní gel stimuluje v HSC-T6 expresi mRNA MMP-2. FGF-1/H způsobuje mírný pokles sekrece pro-MMP-2 a pro-MMP-9.

8. ZÁVĚR

V naší práci jsme se věnovali studiu antifibrotického účinku FGF-1 na primokulturu jaterních MFB a buněčnou linii HSC-T6, která prezentuje dobře zavedený model aktivovaných HSC.

Porovnávali jsme změny exprese genů i proteinů, které jsou charakteristické pro MFB fenotyp. Pomocí TGF- β 1 jsme indukovali MFB fenotyp v buňkách na plastu, což prezentuje stav s vysokou pevností v tahu a dále v buňkách v kolagenním gelu což reprezentuje prostředí s nízkou pevností v tahu. Růstový faktor FGF-1 v kombinaci s heparinem snižoval v buňkách expresi α -SMA a v buňkách na kolagenním gelu i expresi FN-EDA.

Z našich výsledků dále vyplývá, že 3D kultivace v kolagenním gelu významně mění fenotyp jaterních MFB. Dochází ke snížení exprese klíčového profibrogenního cytokinu TGF- β 1 i snížení expresí MFB markerů FN-EDA a α -SMA. Exprese FN-EDA je závislá na TGF- β 1, zatímco exprese α -SMA je v první řadě určena kultivačním prostředím. Kolagenní gel též aktivuje pro-MMP-2. FGF-1/H může mít za určitých podmínek antifibrogenní účinky na jaterní MFB.

Hvězdicové buňky HSC-T6 jsme stimulovali pomocí TGF- β 1. FGF-1/H výrazně snižoval hladiny FN-EDA v obou prostředích a signifikantně snížil expresi α -SMA v buňkách na plastu. Z těchto výsledků jsme došli k závěru, že FGF-1 může mít antifibrogenní účinky také na aktivované HSC.

Narušení TGF- β 1 signální dráhy představuje potenciální strategii pro léčbu fibrózy. Prokázali jsme, že FGF-1 by mohl antagonizovat signály iniciované TGF- β 1 a ovlivňovat tak progresi jaterní fibrózy.

9. POUŽITÁ LITERATURA

Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 2002;296:1646-7

Arora PD, Narani N, McCulloch CAG: The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor- β induction of α -smooth muscle actin in fibroblasts. *American Journal of Pathology* 1999;154: 871-82

Baker KP, Los G. Targeting fibroblast growth factors in cancer. *Oncotarget* 2013;4:952-53

Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115: 209-18

Becerril C, Pardo A, Montano M, Ramos C, Ramírez R, Selman M: Acidic fibroblast growth factor induces an antifibrogenic phenotype in human lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1999;20:1020-7

Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews* 2005;26:63-77

Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 2012;18:727-35

Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *Journal of hepatology* 2002;36:200-9

Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, Ju Y. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *Journal of leukocyte biology* 1994;55: 120-26

Damon DH, Lobb RR, Dámore PA, Wagner JA. Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *Journal of cellular physiology* 1989;138:221-6

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

Gressner AM., Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006;10:76-99

Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2006;21(suppl 3):S88-S91

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growthpromoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *European journal of biochemistry* 1992;298:29-32

Ignotz RA, Massagué J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 1986;261:4337-45

Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007;56:284-92

Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily

type I activin receptore-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology* 2002;62:65-74

Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *The Journal of cell biology* 1994;127:2037-48

Jiroutova A, Peterova E, Bittnerova L, Slavkovský R, Cevelova P, Rezacova M, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. *Physiological Research* 2013;62:15-25

Jiroutová A, Slavkovský R, Cermanová M, Majdiaková L, Hranovcová I, Bolehovská R, Hajzlerová M, Radilová H Ruzsová E, Kanta J. Expression of mRNA related to connective tissue metabolis, in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Experimental and toxikologic pathology* 2007;58:263-73

Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* 1993;120:577-585

Kharbanda KK, Rogers DD, Wyatt TA, Sorrell MF, Tuma DJ. Transforming growth factor- β induces contraction of activated hepatic stellate cells. *Journal of hepatology* 2004;41:60-6

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

Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB: Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Molecular and Cellular Biology* 1990;10:1492-97

Kim SJ, Ballock RT. Cellular and molecular biology of Transforming Growth Factors. In: Nosa M. *Cellular and Molecular Biology of Bone* 2014;98:122

Klagsbury M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin;FGF-heparan sulfate interactions in cell and extracellular matrix. *Current opinion in cell biology* 1990;2:857-63

Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *Journal of hepatology* 1999;30:48-60.

Lambert KE, Huang H, Mythreya K, Blobel GC. The type III TGF- β receptor inhibits proliferation, migration and adhesion in human myeloma cells. *Molecular biology of the cell* 2011;22:1463-72

LaVallee TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, Maciag T. Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *The Journal of cell biology* 1998;141:1647-58

Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 2004;18:816-27

Li D, Friedman SL. Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. *The liver: Biology and Pathobiology* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2001;455-68

Lin H, Chen X, Fu B. Effect of sense and antisense tissue inhibitor metalloproteinase-1 on apoptosis of rat glomerular mesangial cells and its related-gene expressions. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001;81:411-4

Liu XQ, Rajput A, Geng L, Ongchin M, Chaudhuri A, Wan J. Restoration of TGF β type II receptor expression in colon cancer cells with microsatellite instability increases metastatic potential in vivo. *The journal of biological chemistry* 2011; jbc-M111

- Magness N, Bataller R, Yang L, Benner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004;40:1151-9
- Malström J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander E-L, Särnstrand B, Burns JS, Mose-Larsen P, Fey S, Marko-Varga G: Transforming growth factor- β 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Molecular & Cellular Proteomics* 2004;3:466-77
- Maltseva O, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur SK: Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001;42:2490-95
- Mermall V, Post PL, Mooseker MS. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 1998; 279:527-33
- Meyer-ter-Veht T, Gebhardt S, Sebald W, Buttman M, Grehn F, Schlunck G, Knaus P. p38 inhibitors prevent TGF- β -induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:1500-9
- Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Ertl RF, Rennard SI. Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 1996;32:427-433
- Muro AF, Moretti FA, Moore BB, Yan M, Atrasz RG, Wilke CA, Baralle, FE An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;177:638-45
- Nagasaki T, Lieberman MA: Liver contains heparin-binding growth factors as the major growth factor for cultured fibroblasts. *Hepatology* 1991;13:6-14
- O'Connor JW, Gomez EW. Cell adhesion and shape regulate TGF-beta1-induced epithelial-myofibroblast transition via MRTF-A signaling. *PloS one* 2013;8:e83188
- Ogawa T, Tateno C, Asahina K, Fujii H, Kawada N, Obara M, Yoshizato K. Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology* 2007;127:161-74
- Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* 2000;22:108-12
- Peterová E, Mrkvicová A, Podmolíková L, Rezáčová M, Kanta J. The Role of Cytokines TGF-[Beta] 1 and FGF-1 in the Expression of Characteristic Markers of Rat Liver Myofibroblasts Cultured in Three-Dimensional Collagen Gel. *Physiological Research* 2016;65:661-72
- Phanish MK, Heidebrecht F, Nabi ME, Shah N, Niculescu-Duvaz I, Dockrell MEC. The regulation of TGF β 1 induced fibronectin EDA exon alternative splicing in human renal proximal tubule epithelial cells. *Journal of cellular physiology* 2015;230: 286-95
- Ramadori G, Knittel T, Odenthal M, Schwöllner S, Neubauer K, Meyer ZUM, Büschenfelde K-H. Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines. *Gastroenterology* 1992;103:1313-21
- Ramadori G, Saile B. Mesenchymal cells in liver-one cell type or two? *Liver* 2002;22:283-94
- Ramos C, Becerril C, Montaña M, García-De-Alba C, Ramírez R, Checa M, Selman M. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010; 299:L222-L231.

Ramos C, Montaña M, Becerril C, Cisneros-Lira J, Barrera L, Ruiz V, Selman M. Acidic fibroblast growth factor decreases α -smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006;291:L871-L879

Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *Journal of clinical investigation* 1993;92:1795-1804

Serini G, Bochaton-Piallat M-L, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G: The fibronectin domain EDA-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *The Journal of Cell Biology* 1998;142:873-81

Shimbori C, Bellaye PS, Xia J, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- β 1-induced lung fibrosis. *The Journal of Pathology* 2016;240:197-210

Shirol PD, Shirol DD. Myofibroblasts in health and disease. *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2012;3: 23-7

Takahara M, Naruse T, Takagi M, Orui H, Ogino, T. Matrix metalloproteinase-9 expression, tartrate-resistant acid phosphatase activity, and DNA fragmentation in vascular and cellular invasion into cartilage preceding primary endochondral ossification in long bones. *Journal of orthopaedic research* 2004;22:1050-57

Tanahashi T, Suzuki M, Imamura T, Mitsui Y: Re-evaluation of FGF-1 as a potent mitogen for hepatocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 1994;30:139-141

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Experimental cell research* 2000;257:180-189

Wen FQ, Kohyama T, Sköld CM, Zhu YK, Liu X, Romberger DJ, Rennard, SI. Glucocorticoids modulate TGF- β production by human fetal lung fibroblasts. *Inflammation* 2003;27:9-19

Wu J, Rnjak-Kovacina J, Du, Y, Funderburgh ML, Kaplan DL, Funderburgh JL. Corneal stromal bioequivalents secreted on patterned silk substrates. *Biomaterials* 2014;35:3744-55

Xie J, Wang C, Huang DY, Zhang Y, Xu J, Kolesnikov SS, Zhao H. TGF-beta1 induces the different expressions of lysyl oxidases and matrix metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after mechanical injury. *Journal of biomechanics* 2013;46: 890-8

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991;64:841-8

Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, McKeehan WL. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *American journal of pathology* 2003;163:1653-62

Zhao J, Tang N, Wu K, Dai W, Ye C, Shi J, Lin Y. MiR-21 simultaneously regulates ERK1 signaling in HSC activation and hepatocyte EMT in hepatic fibrosis. *PLoS One* 2014;9:e108005

10. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Původní vědecké publikace v časopisech s IF

1. Peterová E, Mrkvicová A, Podmolíková L, Rezacová M, Kanta J. The Role of Cytokines TGF-[Beta] 1 and FGF-1 in the Expression of Characteristic Markers of Rat Liver Myofibroblasts Cultured in Three-Dimensional Collagen Gel. *Physiological Research* 2016;65:661-72. (IF 1,618)
2. Mezera V, Kucera O, Moravcova A, Peterova E, Rousar T, Rychtrmoc D, Cervinkova Z. Comparison of acetaminophen toxicity in primary hepatocytes isolated from transgenic mice with different apolipoprotein E alleles. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2015;66 :863-73. (IF 1,37)
3. Mezera V, Kucera O, Moravcova A, Peterova E, Cervinkova Z. The effect of epigallocatechin gallate on hepatocytes isolated from normal and partially hepatectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2014;92:512-7. (IF 1,91)
4. Mezera V, Kučera O, Moravcová A, Peterová E, Červinková Z. Epigallocatechin gallate does not accelerate the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 2014;59:976-85. (2,516)
5. Jiroutova A, Peterova E, Bittnerova L, Slavkovský R, Cevalova P, Rezacova M, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. *Physiological Research* 2013;62:15-25. (IF 1,618)

Původní vědecké publikace bez IF

6. Peterova E, Podmolikova L, Kanta J, Rezacova M, Mrkvicova A. Fibroblast growth factor-1 suppresses TGF- β -mediated myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells. *Acta medica* přijato do tisku

Přednášky na odborných setkáních

1. Májové Hepatologické dny, Karlovy Vary 2012
Poster na téma: Vliv růstových faktorů na expresi genů v jaterních myofibroblastech
2. Májové Hepatologické dny, Karlovy Vary 2014
Poster na téma: kolagen typu I moduluje účinek FGF-1 na jaterní myofibroblasty
3. 10th Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové 2014
Přednáška na téma: Effect of FGF-1 on liver myofibroblasts cultured *in vitro*
4. Vědecká konference LF a FN, Hradec Králové 2015
Přednáška na téma: Vliv růstového faktoru fibroblastů FGF-1 na expresi genů v jaterních myofibroblastech
5. Vědecká konference LF a FN, Hradec Králové 2015
Přednáška na téma: Zavedení nových praktických cvičení z biochemie se zaměřením na preanalytické vlivy

