**Univerzita Karlova**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# DISERTAČNÍ PRÁCE

**Eva Peterová** **2016**

**Univerzita Karlova**

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

**Lékařská chemie a biochemie**

# Vliv složek extracelulární matrix na buňky kultivované *in vitro*

# The influence of extracellular matrix components to cells cultured *in vitro*

**Mgr. Eva Peterová**

Školitel: doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.
Mgr. Alena Mrkvicová, Ph.D.

Hradec Králové, 2016 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.

Hradec Králové, 2016

Na úvod bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům a kolegům na Ústavu lékařské biochemie LFHK za vytvoření optimálních podmínek pro vytvoření této práce.

Panu doc. RNDr. Jiřímu Kantovi, CSc. děkuji za vedení disertační práce a předání znalostí a dovedností v oblasti molekulární biologie a v problematice jaterních buněk a jaterní fibrózy.

Paní Mgr. Aleně Mrkvicové, Ph.D. děkuji za převzetí postu školitelky a za pomoc při experimentální části práce.

Paní Mgr. Renatě Köhlerové, Ph.D. děkuji za vnášení nového pohledu na problematiku práce.

Paní prof. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. přednostce Ústavu lékařské biochemie, bych ráda poděkovala za věcné připomínky k vlastní práci i textu disertační práce.

Ráda bych též poděkovala laborantkám Ústavu lékařské biochemie, zvláště Petře Kazimírové a Mileně Hajzlerové za pomoc při práci na laboratorních zvířatech.

Dále bych chtěla poděkovat personálu Vivária LFHK za péči o laboratorní zvířata. Prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Ph.D. z Ústavu Farmakologie LFHK děkuji za možnost využívání instrumentálního zázemí.

Ráda bych též poděkovala Univerzitě Karlově za poskytnutí finančních prostředků na realizaci práce. Financování proběhlo z projektů PRVOUK, GAUK a SVV.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a pomoc při pregraduálním i postgraduálním studiu.

OBSAH

1. POUŽITÉ ZKRATKY ..... 11

2. PŘEDMLUVA ..... 13

3. CÍLE PRÁCE ..... 15

4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY ..... 16

4.1. JÁTRA ..... 16

4.2. JATERNÍ FIBRÓZA A CIRHÓZA ..... 16

4.3. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX ..... 19

4.3.1. RECEPTORY PROTEINŮ ECM ..... 20

4.3.1.1. Integriny ..... 20

4.3.1.2. Neintegrinové receptory ..... 21

4.3.2. PROTEINY ECM - KOLAGEN ..... 22

4.3.3. GLYKOSAMINOGLYKANY, PROTEOGLYKANY, GLYKOPROTEINY ..... 24

4.3.4. DEGRADACE ECM ..... 25

4.4. FIBROGENNÍ BUŇKY V JÁTRECH ..... 27

4.4.1. HVĚZDICOVÉ BUŇKY ..... 27

4.4.1.1. HSC za fyziologických podmínek ..... 28

4.4.1.2. Aktivace HSC ..... 28

4.4.1.3. Zánik aktivovaných HSC ..... 30

4.4.2. MYOFIBROBLASTY ..... 30

4.5. RŮSTOVÉ FAKTORY MODULUJÍCÍ BUNĚČNÝ FENOTYP ..... 31

4.5.1. TGF-β1 ..... 31

4.5.2. RŮSTOVÉ FAKTORY FIBROBLASTŮ FGF ..... 33

4.5.2.1. FGF super rodina ..... 33

4.5.2.2. FGF-1 ..... 34

5. METODICKÁ ČÁST ..... 36

5.1. LABORATORNÍ ZVÍŘATA ..... 36

5.2. PERFUZE JATER A IZOLACE JATERNÍCH MYOFIBROBLASTŮ ..... 36

5.2.1. Perfuze ..... 36

5.2.2. Izolace buněk ..... 36
5.3. KULTIVACE BUNĚK ..... 37
5.4. PŘÍPRAVA KOLAGENNÍHO GELU ..... 37
5.5. IZOLACE RNA ..... 38
5.6. REVERZNÍ TRANSKRIPCE A qPCR ..... 38
5.7. WESTERN BLOT ..... 39
5.8. IMUNOCYTOCHEMIE ..... 40
5.9. ZYMOGRAFIE ..... 40
5.10. ELISA ..... 41
5.11. STANOVENÍ DNA ..... 41
5.12. WST-1 TEST ..... 42
5.13. STATISTICKÁ ANALÝZA ..... 42
6. VÝSLEDKOVÁ ČÁST ..... 43
6.1. VLIV RŮSTOVÉHO FAKTORU FIBROBLASTŮ FGF-1 NA JATERNÍ MYOFIBROBLASTY *IN VITRO* ..... 43
6.1.1. CHARAKTERIZACE BUNĚK NA ZÁKLADĚ MORFOLOGIE A EXPRESE α-SMA ..... 43
6.1.2. CHARAKTERIZACE BUNĚK NA ZÁKLADĚ EXPRESE GENŮ MFB FENOTYPU ..... 45
6.1.3. VLIV KULTIVAČNÍHO PROSTŘEDÍ NA PROLIFERACI MFB A EXPRESI PROTEINŮ MFB FENOTYPU ..... 46
6.1.4. KONCENTRAČNÍ ŘADA PŮSOBENÍ FGF-1 ..... 48
6.1.5. VLIV FGF-1/H NA PROLIFERACI MFB ..... 50
6.1.6. ČASOVÁ KŘIVKA PŮSOBENÍ FGF-1/H NA EXPRESI PROTEINŮ ..... 51
6.1.7. VLIV FGF-1/H NA AKTIVITU ŽELATINÁZ ..... 53
6.1.8. EXPRESE PROTEINŮ PO INHIBICI TGFRI ..... 54
6.1.9. EXPRESE PROTEINŮ PO INHIBICI SIGNÁLNÍ DRÁHY MEK/ERK ..... 58
6.2. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA BUNĚČNOU LINII HSC-T6 ..... 61
6.2.1. MORFOLOGIE BUNĚK ..... 61
6.2.2. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA EXPRESI mRNA MARKERŮ MFB FENOTYPU ..... 63

6.2.3. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA EXPRESI MARKERŮ MFB FENOTYPU ..... 65

6.2.4. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA PROTEOLYTICKOU AKTIVITU ..... 66

7. SHRNUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ .....71

8. DISKUZE.....72

8.1. VLIV FGF-1/H NA JATERNÍ MFB *IN VITRO* ..... 72

8.2. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA BUNĚČNOU LINII HSC-T6 ..... 76

9. ZÁVĚR.....78

10. PŘEHLED LITERATURY.....79

11. PŘÍLOHY.....93

# 1. POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|---|---|
| α-SMA | Hladkosvalový α aktin |
| CTGF | Růstový faktor pojivové tkáně |
| DDR | Discoidin Domain Receptor |
| DMEM | Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium |
| ECGF-β | Růstový faktor endotelových buněk |
| ECM | Extracelulární matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EGF | Epidermální růstový faktor |
| EMT | Epitelo-mezenchymální tranzice |
| ERK | Kináza regulující extracelulární signál |
| FACIT | Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices |
| Fbln2 | Fibulin 2 (gen) |
| FBS | Fetální bovinní sérum |
| FGF | Růstový faktor fibroblastů |
| FGF-1/H | FGF-1 v kombinaci s heparinem |
| FGFR | Receptor pro FGF |
| Fndc3a | Fibronectin type III domain containing 3a (gen pro FN-EDA) |
| FN-EDA | Fibronektin obsahující extra doménu A |
| GFAP | Kyselý gliový fibrilární protein |
| HBBS | Hanksův roztok |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina |
| HSC | Jaterní hvězdicové buňky |
| HSC-T6 | Buněčná linie aktivovaných hvězdicových buněk |
| IL | Interleukin |
| JNK | c-Jun NH2-terminální kináza |
| LAP | Latentní peptid asociovaný s TGF |
| LLC | Velký latentní komplex |

| | |
|---|---|
| LTBP | Protein vázající latentní TGF |
| MACIT | Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices |
| MCP-1 | Monocytární chemotaktický protein 1 |
| M-CSF | Růstový faktor makrofágů |
| MEK | Mitogenem aktivovaná kináza kináza |
| MFB | Myofibroblasty |
| MMP | Matrix metalopoteináza |
| n | Počet stanovení |
| NK | Přirození zabíječi |
| p38 | Protein 38 |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PDGF | Růstový faktor destiček |
| PI3K | Fosfatidylinositol-3-kináza |
| qPCR | Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase |
| RONS | Reaktivní formy kyslíku a dusíku |
| SDS | Dodecylsulfát sodný |
| SLC | Malý latentní komplex |
| TBS | Tris pufr |
| TGFR | Receptor pro TGF-β1 |
| TGF-β | Růstový transformující faktor β |
| TIMP | Tkáňový inhibitor matrix metaloproteináz |
| TNF | Tumor nekrotizující faktor |
| u-PA | Urokinázový aktivátor plazminogenu |
| VCAM-1 | Adhezivní molekula cévních buněk |
| VEGF | Vaskulární a endotelový růstový faktor |
| WST-1 | 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl |

# 2. PŘEDMLUVA

Jaterní fibróza je dynamický proces, při kterém dochází k nadměrnému ukládání vazivové tkáně. Nástup jaterní fibrózy je pozvolný a k většině komplikací dochází až po rozvinutí cirhózy. Ukládání vaziva ovlivňuje jaterní funkce, jeho nejzávažnějším následkem je portální hypertenze a komlikace s ní spojené. V roce 2012 bylo v České republice 24 208 pacientů s jaterní fibrózou a cirhózou. Ročně je diagnostikováno přibližně 1 700 nových pacientů (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky). V posledních letech dosáhl výzkum problematiky jaterní fibrózy a cirhózy velkého pokroku zjištěním, že i pokročilá fibróza může být reverzibilní děj. V naší práci jsme se zabývali růstovými faktory přítomnými ve fibrotických i zdravých játrech a jejich vlivu na reverzibilitu fibrózy.

Jaterní tkáň se skládá z hepatocytů, endotelových buněk, tkáňových makrofágů (Kupfferovy buňky) a perivaskulárních mezenchymálních buněk – hvězdicových buněk (HSC). Při poškození jater dochází k nekróze jaterního parenchymu. K následné fibrotizaci tkáně přispívají HSC a myofibroblasty (MFB). Výzkum celého procesu vedoucího k fibrotizaci tkáně v posledních dvou desetiletích pomohl k popsání dynamiky jizvení tkáně a pochopení celé řady molekulárně biologických mechanismů, které jej kontrolují. Zásadním momentem byla identifikace HSC jako hlavních producentů kolagenu v játrech. Za fyziologických podmínek je jejich hlavní funkcí skladování vitaminu A. Po poškození jater dochází k proliferaci a aktivaci HSC. Výsledkem aktivace je přeměna na buňky MFB typu. Hlavním cytokinem podporujícím přeměnu klidových HSC na aktivované je transformující růstový faktor TFG-β1. Potencuje syntézu proteinů extracelulární matrix (ECM) a inhibuje jejich odbourávání.

ECM tvoří složitou síť, která slouží jako opora buněk a poskytuje jim životně důležité signály. Při poškození jater se mění kvantita i kvalita ECM, obsah kolagenu se třikrát zvyšuje. Hromadění ECM je charakteristickým rysem jaterní fibrózy. Působení ECM lze do určité míry napodobit kultivací buněk v gelu obsahujícím složky ECM, například kolagen typu I. Proteolýza ECM je zprostředkována enzymy matrix metaloproteinázami (MMP) a tkáňovými

inhibitory matrix metaloproteináz (TIMP). Během akutního poškození jater pod vlivem cytokinů a růstových faktorů, včetně TGF-β1, rostou hladiny MMP, což naznačuje jejich roli při remodelaci jaterní tkáně.

Růstový faktor fibroblastů FGF-1 ovlivňuje proliferaci, migraci a diferenciaci buněk v různých tkáních. V kombinaci s heparinem má antifibrogenní účinky na plicní fibroblasty (Ramos a spol., 2006). Růstovému faktoru FGF-1 byla dosud věnována daleko menší pozornost než faktoru FGF-2, i když se oba ve fibrotických játrech vyskytují a jejich koncentrace se v průběhu fibrózy mění. Cílem této práce je objasnit působení FGF-1 na MFB a HSC nejen za podmínek běžně užívaných v tkáňových kulturách, ale i v prostředí, kdy jsou buňky obklopeny složkami ECM, jako je kolagen I.

# 3. CÍLE 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-β1 a FGF-1 na buněčnou linii HSC-T6 na plastu a v 3D prostředí kolagenního gelu.

# 4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

## 4.1. JÁTRA

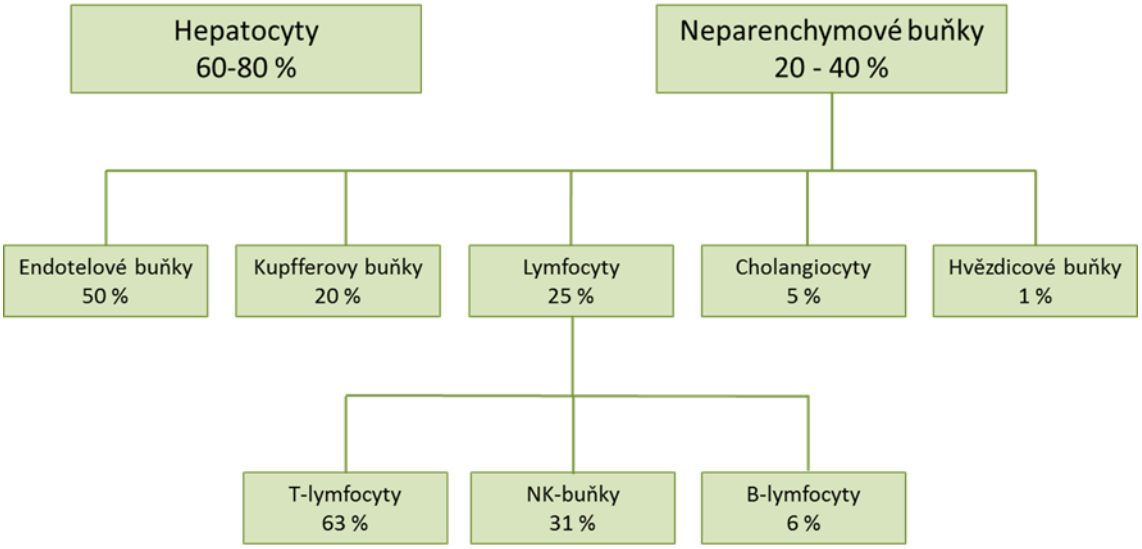
Játra jsou největší žlázou v lidském těle. Zastávají klíčovou úlohu v zajišťování látkové výměny, zejména v metabolismu lipidů, sacharidů a aminokyselin. Účastní se detoxikace xenobiotik a amoniaku, syntézy bílkovin krevní plazmy, syntézy a degradace hormonů a syntézy žluči. Játra slouží také jako zásobárna glykogenu, železa a vitaminu A.

Játra se nacházejí na pravé straně dutiny břišní pod bránicí, mají přibližně klínovitý tvar. Základní morfologickou jednotkou jater je jaterní lalůček. Játra dospělého jedince obsahují 50 až 100 tisíc lalůčků. Lalůčky jsou tvořeny hvězdicovitými trámci hepatocytů, které obklopují centrální žílu ve středu lalůčku. Mezi trámci probíhají sinusoidy. Nacházejí se zde také žlučové kanálky, které se sbíhají do terminálních žlučovodů uložených mezi sousedními lalůčky. Součástí výstelky jaterních sinusoid tvořené endotelovými buňkami jsou Kupfferovy buňky. Mezi stěnami sinusoid a jaterními buňkami se nachází perisinusoidálni Disseho prostor. Disseho prostor je vyplněn jemnou sítí retikulárních vláken, nacházíme zde také HSC. Kromě parenchymových buněk (hepatocyty) je v jaterní tkáni zastoupena neparenchymová frakce, do které řadíme Kupfferovy buňky, endotelové buňky, HSC a NK buňky (Ehrmann a spol., 2014). Procentuální zastoupení buněk je uvedeno na obrázku č. 1. HSC, jejichž studiu je předmětem této ráce, se vyskytují v přibližně 1 %.

## 4.2. JATERNÍ FIBRÓZA A CIRHÓZA

Zatímco v minulosti byla fibróza považována za nevratný proces, v současné době je pokládána za proces dynamický. Je reakcí na chronické poškození jaterní tkáně. 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 hlavní producenty kolagenu v játrech označeny HSC (Bataller a Brenner 2005).

Pozdější experimenty prokázaly, že i pokročilá jaterní fibróza je reverzibilní, přičemž nezbytná degradace ECM je řízena HSC (Bataller a Brenner 2005). Nejúčinnější antifibrogenní terapií však i nadále zůstává odstranění fibrogenního stimulu.




**Obrázek č. 1: Procentuální zastoupení buněk jaterní tkáně (převzato z Ehrmann a spol., 2014)**

Jaterní cirhóza je pokročilé stádium jaterní fibrózy, která je doprovázena narušením jaterní vaskularity. Je charakteristická tvorbou regeneračních uzlů ohraničených vazivem. Mezi hlavní důsledky jaterní cirhózy patří poškození funkce jaterních buněk, portální hypertenze a rozvoj hepatocelulárního karcinomu.

Nástup jaterní fibrózy je většinou pozvolný a k většině komplikací dochází až po rozvinutí cirhózy. Průběh fibrózy ovlivňuje kombinace genetických a environmentálních faktorů. Během epidemiologických studií byly identifikovány polymorfismy v několika genech (interleukin 10, TGF-β1, CD14 atd.), které mohou mít vliv na progresi jaterní fibrózy (Bataller a Brenner, 2005). Environmentálních faktorů je celá řada a většinou se jedná o kombinaci několika faktorů. Klíčovým faktorem je zánět jaterního parenchymu vyvolaný nejčastěji virovými hepatitidami, metabolickými chorobami (nealkoholická steatohepatitida, Wilsonova choroba, hemochromatóza), autoimunitními reakcemi nebo

chronickým působením toxických látek (alkohol aj.) (Ehrmann a Hůlek, 2014). V našich podmínkách jsou nejčastějšími příčinami hepatitida B a C a alkoholismus.

K poškození hepatocytů dochází především vlivem hypoxie, oxidačního stresu ze zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS), žlučovými kyselinami při cholestáze, nebo tumor nekrotizujícím faktorem (TNF) u virových onemocnění. Fibrogenní kaskáda je aktivována lysosomálními enzymy uvolněnými z odumřelých hepatocytů.

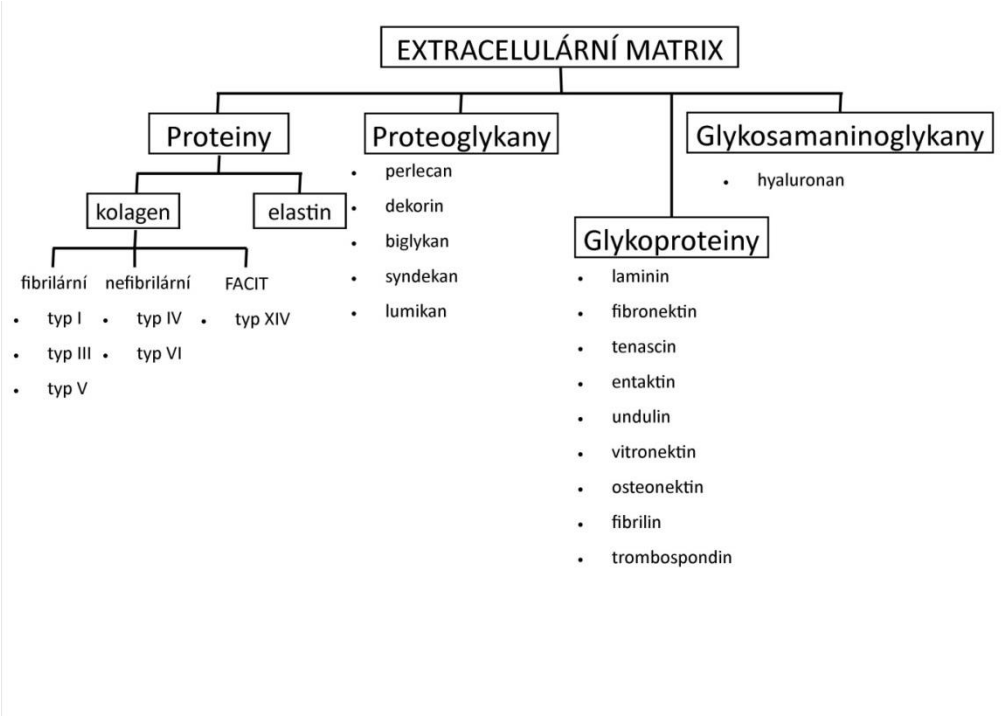
Působením lysosomálních enzymů dochází k uvolňování chemokinů, růstových faktorů a ostatních cytokinů z ECM, což vede k aktivaci Kupfferových buněk, fagocytóze apoptických i nekrotických hepatocytů a syntéze dalších cytokinů (Alcolado a spol., 1997). Cytokinové molekuly tvořené Kupfferovými buňkami stimulují proliferaci a aktivaci HSC, fibroblastů a hepatocytů na MFB. Kromě toho působí chemotakticky na prozánětlivé buňky i HSC. V důsledku těchto změn dochází ke zvýšené tvorbě ECM, převážně kolagenů typu I a III, proteoglykanů a glykoproteinů a jejich ukládání v Disseho prostoru. V případě přetrvávajícího poškození HSC a MFB proliferují a dochází k parakrinní i autokrinní aktivaci buněk zejména prostřednictvím TGF-ß1 a další produkci kolagenu typu I (Olaso, 1998). Hromaděním fibrózní matrix je omezen pohyb metabolitů mezi krví v sinusoidách a hepatocyty, čímž dochází k dalšímu poškození funkce hepatocytů. K regeneraci jater provázené degradací fibrotické tkáně dochází hlavně u poškození jater, které je intenzivní, ale tvá krátce. U poškození, ke kterým dochází opakovaně v menší intenzitě, je regenerace slabší a proces fibrotizace výraznější.

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 pro získání MFB 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.

## 4.3. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

ECM je složena z glykosaminoglykanů, proteoglykanů, glykoproteinů, kolagenů a z multiadhezních molekul (obr. č. 2). ECM v Disseho prostoru se skládá především z fibronektinu a kolagenu typu I, III, V. Toto složení je vhodné pro usnadnění oboustranné výměny makromolekul mezi plazmou a hepatocyty (Martinez-Hernandez a Amenta, 1992).




**Obrázek č. 2: Složení ECM (převzato z Gressner a Weikirchen, 2006)**

V nepoškozených játrech ECM tvoří nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně a poskytuje signály pro přítomné buňky (hepatocyty, HSC, myofibroblasty, epiteliální buňky, atd.). Adhezivní interakce mezi buňkami a proteiny ECM hrají důležitou roli v embryonální morfogenezi a v regulaci genové exprese v buňkách dospělého organizmu (Juliano a Haskill, 1993). Signály se dostávají pomocí specifických buněčných receptorů (integriny

a neintegrinové receptory) intracelulárně na cytoskelet, odkud přes různé signální dráhy ovlivňují transkripci genů a tím ovlivňují migraci, proliferaci a diferenciaci buněk.

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 myofibroblasty.

### 4.3.1. RECEPTORY PROTEINŮ ECM

Komunikace mezi buňkami a ECM je zprostředkována integrinovými a neintegrinovými receptory. Neintegrinové receptory zahrnují povrchově vázané proteoglykany (syndekan, CD44) a receptory s discoidinovou doménou (DDR). Nejdůležitější receptory zajišťující interakci mezi buňkami a ECM jsou integriny a DDR.

#### 4.3.1.1. Integriny

Integriny jsou skupinou heterodimerních receptorů lokalizovaných na povrchu buněk. Receptory tvoří nekovalentně vázané podjednotky α a β. V současné době je známo 16 typů α podjednotek a 9 typů β podjednotek. Kombinací podjednotek α a β vznikají heterodimery, které se liší schopností vázat různé ligandy (příklady viz. tabulka č. 1). Každá podjednotka je složená ze dvou extracelulárních domén, transmembránové části a krátké cytoplazmatické domény. Vazba integrinu na ligand závisí na extracelulární koncentraci dvojmocných kationtů $Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$ a $Ca^{2+}$. (Elbe, 2013).

Některé integriny - například α5β1, který patří mezi fibronektinové receptory, interagují pouze s jedním proteinem ECM. Běžnější však jsou integriny, které váží několik odlišných ligandů. Buňky často exprimují více integrinů schopných reagovat s jedním konkrétním proteinem ECM. Je známo alespoň 8 integrinů vázajících fibronektin a 5 vázajících laminin.

Existují dva pohledy na mechanismus přenosu signálu integriny. Jedna z teorií naznačuje, že integriny přenášejí signál na cytoskelet, čímž regulují tvar buněk a vnitřní buněčné uspořádání. Tvar buňky a organizace cytoskeletu může regulovat expresi celé řady genů a tím i ovlivňovat buněčný růst nebo diferenciaci buněk. Druhá teorie integriny zprostředkované signalizace je považuje za skutečné receptory, které jsou schopné vyvolat biochemické signály v buňce. Některé studie ukázaly, že po vazbě ligandu na integrin dochází k aktivaci tyrozinové kaskády (Juiano a Haskill, 1993).

Z integrinů, které zprostředkovávají vazbu buněk na kolagen a fibronektin, HSC exprimují integriny α1β1, α2β1 a α5β1. Aktivace HSC zvyšuje expresi integrinu α5β1, jehož interakce s ECM vede ke zvýšení syntézy kolagenu. Na druhé straně stimulace αvβ3 a αvβ5 vede k aktivaci proteináz MMP-2, MMP-3 a MMP-9, což má za následek zvýšenou degradaci ECM. Integriny spolupracují s růstovými faktory přítomnými v ECM. Například αvβ6 a αvβ8 aktivují latentní formu TGF-β1.

| Receptor | Ligand |
|---|---|
| **α1β1** | Laminin, kolagen |
| **α2β1** | Laminin, kolagen, fibronektin |
| **α3β1** | Laminin, kolagen, fibronektin |
| **α4β1** | Fibronektin, VCAM-1 |
| **α5β1** | Fibronktin |
| **α6β4** | Laminin |
| **αvβ5** | Vitronektin |
| **αvβ6** | Fibronektin, LTBP |

**Tabulka č.1: Příklady integrinů a jejich ligandů**

#### 4.3.1.2. Neintegrinové receptory

Rodina receptorů s diskoidinovou doménou (DDR) jsou tyrozinkinázové receptory, které váží s vysokou afinitou kolagen a stimulují syntézu MMP. Jsou podobné typickým tyrozinkinázovým receptorům, ale jejich extracelulární část obsahuje diskoidinovou doménu shodnou s doménou u hlenky *Dictyostelium discoidin*. DDR rodina zahrnuje dva typy receptorů, DDR1 a DDR2. (Hou a spol., 2001, Vogel a spol., 2006).

DDR1 a DDR2 se od sebe liší afinitou k různým typům kolagenu. DDR1 váže jak fibrilární tak nefibrilární kolagen (typ I – V, VIII a XI), zatímco DDR2 je aktivován pouze fibrilárními typy (zejména I a III). Oba typy receptorů se hojně vyskytují v lidských tkáních, ale jejich distribuce v buňkách se vzájemně vylučuje. DDR1 je přítomen především v epitelových tkáních a je zapojen do růstu některých epiteliálních nádorů, včetně karcinomu prsu. Na rozdíl od toho DDR2 se nachází v mezenchymálních buňkách a vyskytuje ve vysokých koncentracích v buňkách stromatu v blízkosti nádorových buněk pozitivních na DDR1 (Olaso a spol., 2001).

DDR receptory se aktivují pouze, je-li kolagen v nativním stavu. Denaturovaný kolagen, který již nemá strukturu trojšroubovice, například želatina, nedokáže indukovat aktivitu kinázy. Na rozdíl od většiny tyrozinkinázových receptorů, které jsou plně aktivovány během několika málo minut, k aktivaci DDR dochází až několik hodin od vazby kolagenu na receptor. Receptory se skládají z extracelulární α podjednotky a membránově vázané β podjednotky, která obsahuje intracelulární doménu. Hladina DDR1 v cirhotických játrech je v porovnání s nepoškozenými játry několikanásobně zvýšena. Zvýšená exprese je pozorována v hepatocytech, leukocytech a buňkách žlučového epitelu (Song a spol., 2011). Ve svých studiích Olaso a kolektiv prokázali, že indukce jaterní fibrózy na zvířecích modelech měla za následek i up-regulaci DDR-2 v HSC (Olaso a spol., 2001). Nicméně nárůstu exprese DDR-2 předcházela zvýšená syntéza kolagenu, což naznačuje, že DDR-2 spíše udržuje fibrózu, než aby ji aktivoval (Vogel a spol., 2006).

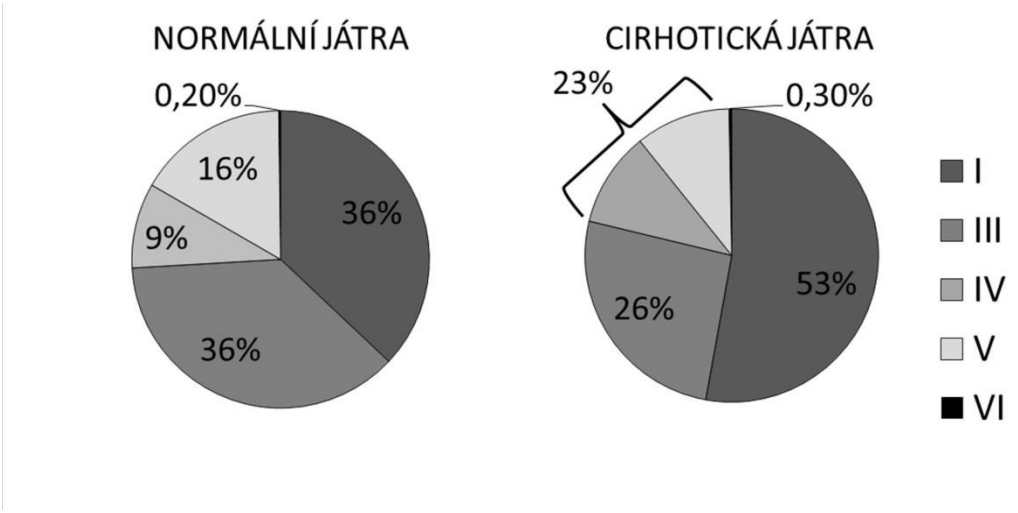
### 4.3.2. PROTEINY ECM - KOLAGEN

Kolagen patří mezi nejrozšířenější proteiny v lidském těle, tvoří přibližně 25 % všech bílkovin. Polypeptidový řetězec obsahuje opakující se sekvence aminokyselin, Glycin-X-Y, kdy X je nejčastěji prolin a Y je často hydroxyprolin, který vzniká postranslační modifikací prolinu. Během syntézy dochází ke glykosylaci některých hydroxylysinů a vzniká řada intermolekulárních vazeb mezi aminokyselinami v řetězcích. Charakteristickým znakem kolagenu je jeho trojřetězcová helikální struktura, kde jsou kolem sebe obtočeny tři polypeptidové řetězce. Řetězce jsou buď totožné, nebo vzniká heterotrimer. Například kolagen

typu I se vyskytuje ve dvou formách. Jedna forma je heterodimer skládájící se z dvou řetězců α1 a jednoho řetězce α2 - $[\alpha_{1(I)}]_2\alpha_{2(I)}$. Druhá forma je homodimer, který tvoří tři řetězce α1 - $[\alpha_{1(I)}]_3$. Translací z několika genů vnikají vlákna pro-α-řetězců, které ještě v buňce procházejí posttranslačními modifikacemi (hydroxylace a glykosylace) a agregují do trojšroubovice prokolagenu. Prokolagen je uzavřen do vezikul a dochází k odštěprní nehelikálních segmentů, čímž vzniká základní monomerní jednotka kolagenu – tropokolagen. Ten se exocytózou dostává mimo buňku, kde polymeruje do kolagenních mikrofibril. Mikrofibrily se skládají do fibril a ty poté do kolagenních vláken. Extracelulárně monomery tropokolagenu polymerují a vzniká kolagenní vlákno. Kolagenní fibrily jsou zpevněny kovalentními příčnými vazbami (cross-link), které vznikají mezi lysinem a hydroxylysinem.

Kolageny jsou rozděleny do čtyř podskupin: fibrilární kolageny (typ I, II, III, V a XI), FACIT kolagen (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices; typy IX, XII, XIV, WVI, XX a XXI), kolageny bazální membrány (typ IV) a MACIT kolageny (Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices; typy XIII a XVII).

V lidském těle se nachází více než dvacet druhů kolagenu, přičemž v lidských játrech bylo dosud nalezeno deset různých typů. Rozložení kolagenu ve zdravých a cirhotických játrech je uvedeno na obrázku 3. Ve fibrotických játrech je obsah kolagenu zvýšen, až čtrnáctkrát. Stoupá zastoupení fibrilárních kolagenů typu I (Gressner a Weiskirchen, 2006).




**Obrázek 3: Distribuce kolagenu v normálních a cirhotických játrech (upraveno z Gressner a Weiskirchen, 2006)**

### 4.3.3. GLYKOSAMINOGLYKANY, PROTEOGLYKANY, GLYKOPROTEINY

Glykosaminoglykany tvoří opakující se disacharidové podjednotky. Obsahují aminocukry (N-acetyl-D-galaktosamin nebo N- acetyl-D-glukotosamin) navázaný na uronovou kyselinu (D-glukuronovou nebo L-iduronovou). Glykosaminoglykany, proteoglykany a glykoproteiny tvoří silně hydratovaný gel, což je způsobeno negativně nabitými sulfátovými skupinami spolu s karboxylem.

Proteoglykany jsou složené proteiny, na které jsou kovalentně navázány glykosaminoglykany. Jediným volným glykosaminoglykanem je kyselina hyaluronová. Je součástí většiny tkání. Její obsah ve fibrotických játrech stoupá spolu s hladinami kolagenu (Gressner a Weiskirchen, 2006).

Mezi glykoproteiny obsažené v ECM řadíme laminin, fibronektin, tenascin, entaktin, fibulin a osteonektin. Laminin tvoří síť bazální membrány a je schopen vázat perlekan a kolagen a tvořit nadmolekulové útvary vazbou na buněčné integriny. Fibronektin ovlivňuje buněčnou adhezi, morfologii, migraci a cytoskeletální organizaci. Vytváří granule a filamenta, která se ukládají do elastinové sítě. Osteonektin a tenascin spíše než strukturní funkci plní funkci signalizační. Váží se na buněčné receptory, interagují s proteázami, hormony

i se strukturními proteiny ECM. Jejich hladiny se mění během embryonálního vývoje a za patologických stavů (Bornstein, 2009).

Proteoglykany jsou tvořeny kyselinou hyaluronovou, proteiny a glykosaminoglykany. Jejich klasifikace záleží na složení glykosaminoglykanového řetězce. V játrech jsou proteoglykany zastoupeny perlekanem, syndekanem, biglykanem, dekorinem a heparansulfátem. Heparansulfát je za fyziologických podmínek odpovědný za vazbu FGF, kdežto dekorin a biglykan reverzibilně váží TGF-β1. Během jaterní fibrózy dochází k poklesu exprese heparansulfátu a nárustu exprese glykosaminoglykanů dermatan a chondroitinsulfátu. Hyaluronan je produkován aktivovanými HSC a jeho koncentrace během fibrózy osmkrát stoupá (Alcolado a spol., 1997).

### 4.3.4. DEGRADACE ECM

Množství a kvalita ECM je závislá na syntéze a degradaci jejich složek. Při degradaci fibrotické tkáně v játrech se uplatňují enzymy MMP, které jsou produkovány především HSC (Li a Friedman 2001). MMP jsou schopné štěpit téměř všechny složky ECM a bazální membrány.

MMP jsou tvořeny N-terminálním signálním peptidem, propeptidem, katalytickou doménou obsahující $Zn^{2+}$ a hemopexinovou doménou obsahující vazebné místo pro TIMP. MMP jsou exprimovány jako proenzymy, které jsou aktivovány mimo buňku odštěpením propeptidové domény. K přeměně na biologicky aktivní formu dochází pomocí proteáz (plazmin, trypsin, plasmový kalikrein) (Santala a spol., 1999, Saunders a spol., 2005) nebo oxidačním stresem. V některých případech je pro-MMP štěpena jinou již aktivní MMP. Část vytvořených molekul proenzymů je vylučována do extracelulárního prostoru a část molekul MMP zůstává ukotvena v cytoplazmatické membráně (Sternlicht, 2001).

MMP jsou regulovány na několika úrovních. Na úrovni genů může být jejich exprese pod vlivem TGF-β1 a jiných růstových faktorů, ale i mezibuněčnými interakcemi nebo interakcemi mezi buňkou a ECM. Dalšími

úrovněmi regulace je aktivace proenzymu či inhibice enzymu. Inhibice se kromě tkáňových inhibitorů TIMP účastní i α2-makroglobulin.

Kolagenázy MMP-1, MMP-8 a MMP 13 jsou produkovány širokou škálou buněk, mimo jiné i HSC, myofibroblasty, endotelovými buňkami, makrofágy a neutrofily vyskytujícími se v jaterní tkáni. Kolagenázy jsou schopné proteolytického štěpení fibrilárních kolagenů, což vede k rozvinutí helikální struktury kolagenu, který se stává náchylnější k degradaci ostatními enzymy. Kolagen typu I je štěpen srovnatelně MMP-1, MMP-8 i MMP-13 (Mitchell a spol 1996, Marini a spol., 2000). Dalšími substráty jsou např. perlekan a agrekan (Arner a spol., 1997).

Želatináza MMP-2 je tvořena především endotelovými buňkami (Lafleur a spol., 2002), degraduje fibrillin a kolagen typu IV (Kraft a spol., 2002). Při aktivaci pro-MMP-2 se uplatňují TIMP-2 a MMP-14. Dochází k vytvoření komplexu obsahujícího pro-MMP-2, TIMP-2 a MMP-14. K aktivaci jsou nutné alespoň dvě molekuly MMP-14. Jedna molekula je vázána v komplexu a druhá je volná a může štěpit pro-MMP-2. TIMP-2 musí být vůči MMP-2 ve správném stechiometrickém poměru, v případě, že koncentrace TIMP-2 je příliš vysoká dochází k potlačení exprese MMP-14 i MMP-2. Želatináza MMP-9 je secernována monocyty, makrofágy a endotelovými buňkami. Na rozdíl od MMP-2 je MMP-9 schopná přímé proteolýzy kolagenu typu I. Kromě želatiny a kolagenu typu I MMP-9 štěpí interleukin 8 (IL-8), čímž spouští aktivační kaskádu TGF-β1 (Diekmann a Tschesche, 1994).

Mezi stromelysiny patří MMP-3, MMP-7, MMP-10 a MMP-11. Enzymy této skupin jsou syntetizovány fibroblasty, monocyty a makrofágy. MMP-10 je tvořen i v endotelových buňkách a HSC. Substráty jsou především kolagen typu IV (Imai a spol., 1995), fibronektin (del Mar Barbacid a spol., 1998), laminin a fibrinogen (Bini a spol., 1999). MMP-3 hraje důležitou roli v aktivační kaskádě želatináz a MMP-13.

MMP membránového typu jsou lokalizovány na řadě buněk. Hepatocyty exprimují MMP-15, endotelové buňky MMP-16 a monocyty MMP-17. Mezi

jejich substráty patří kolageny typů I, II, II, IV a V, fibronektin, laminin, želatina aj. MMP-14 uvolňuje na membráně vázaný betaglykan (Loyden a spol., 2007). Mají význam v aktivaci jiných MMP, především MMP-2 a MMP-13 (Sato a spol., 1997).

Metaloelastáza MMP-12 je produkována monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami v neaktivní formě. K aktivaci dochází pomocí plazminu, trombinu (Raza a spol., 2000) aj. Substrátem je myelin, kolagen typu IV, fibronektin, laminin, proteoglykan, elastin (Shapiro a spol., 1993) aj.

Produkce účinných MMP závisí mimo jiné na množství produkovaných TIMP. TIMP 1-4 jsou tvořeny řadou buněk mimo jiné i myofibroblasty, HSC, endotelovými buňkami, makrofágy a monocyty, které se nacházejí v jaterní tkáni. Hlavní funkcí TIMP je inhibice MMP. TIMP-1 působí také jako růstový faktor pro řadu buněk (Hayakawa a spol. 1992) a potlačuje apoptózu HSC (Lin a spol. 2001). TIMP-2 kromě aktivace či inhibice MMP-2 inhibuje angiogenezi (Seo a spol., 2003) a proliferaci endotelových buněk, kterou vyvolaly angiogenní růstové faktory. TIMP-3 reguluje TNF-α (Kassiri a spol., 2005) a TGF-β1 (García-Alvarez a spol., 2009) a na rozdíl od TIMP-1 jeho zvýšená exprese indukuje apoptózu (Matthews a spol., 2007). TIMP-4 inhibuje aktivitu MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 (Liu a spol., 1997), MMP-14 (Hernandez-Barrantes a spol., 2001), MMP-19 (Stracke a spol., 2000) aj.

## 4.4. FIBROGENNÍ BUŇKY V JÁTRECH

### 4.4.1. HVĚZDICOVÉ BUŇKY

HSC spolu s portálními fibroblasty a v malé míře i s hepatocyty jsou zdrojem buněk myofibroblastického fenotypu. Nachází se v Disseho prostoru, kde jsou v přímém kontaktu s endotelovými buňkami sinusoid a hepatocyty (Jezequel a spol., 1984, Li a Friedman, 2001). Jejich tělo má vřetenovitý tvar, ze kterého vycházejí dlouhé cytoplazmatické výběžky. Právě cytoplazmatické výběžky umožňují těsné spojení s okolními buňkami. Zasahují mezi hepatocyty, ale nacházejí se i pod buňkami endotelu, kde se obtáčejí kolem sinusoid. Toto uspořádání napomáhá mezibuněčnému transportu mediátorů a cytokinů.

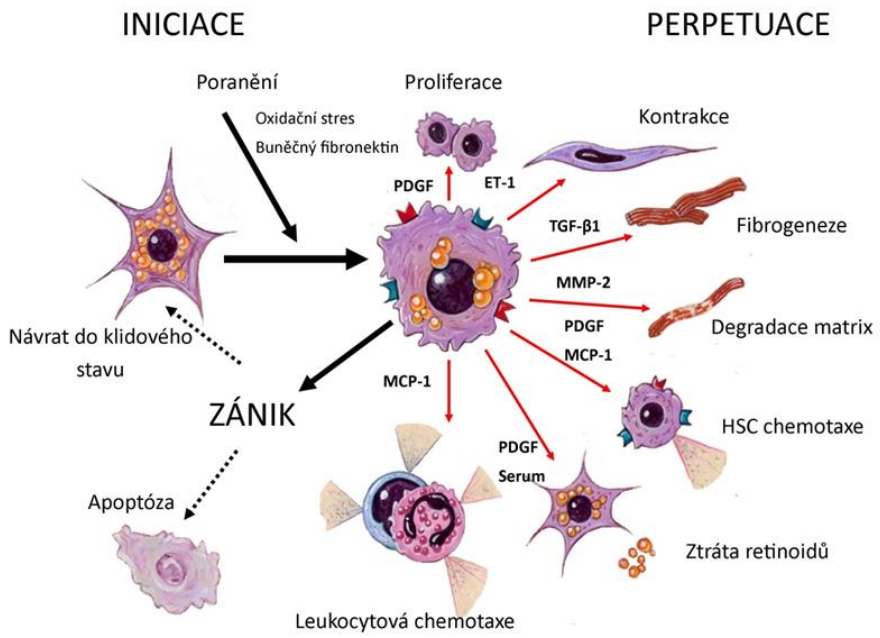
#### 4.4.1.1. HSC za fyziologických podmínek

Ve zdravých játrech jsou HSC zastoupeny přibližně jedním procentem z celkového počtu buněk. Za fyziologických podmínek je jejich hlavní funkcí skladování vitaminu A v charakteristických tukových kapénkách ve formě esterů retinolu-retinoidů. Více než osmdesát procent retinoidů v játrech je uloženo právě v HSC. Celkový počet HSC je závislý na množství vitaminu A v organismu (Senoo a spol., 1997).

K dalším funkcím HSC ve zdravých játrech patří stimulace proliferace NK buněk (Naturals Killers) imunitního systému, pomocí IL-15. Slouží též jako antigen prezentující buňky T- lymfocytům.

#### 4.4.1.2. Aktivace HSC

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 (obr. č. 4).




**Obrázek č. 4: Aktivace HSC (převzato z Friedman, 2008)**

V časné fázi, tzv. iniciaci, jsou HSC parakrinně stimulovány okolními buňkami a změnami ve složení ECM. Poškození endotelových buněk má za následek uvolnění buněčného fibronektinu (izoforma EDA). Dále endotelové buňky vytvářejí urokinázový aktivátor plazminogenu (u-PA), který má vliv na přeměnu TGF-β1 z latentní na aktivní profibrogenní formu. TGF-β1 lze považovat za hlavní profibrogenní cytokin. Podporuje přeměnu klidových HSC na aktivované, potencuje syntézu proteinů ECM a inhibuje jejich odbourávání. Dalším důležitým zdrojem parakrinních podmětů jsou krevní destičky, které produkují růstový faktor destiček (PDGF), epidermální růstový faktor (EGF) a TGF-β1. Kupfferovy buňky prostřednictvím cytokinů (především TGF-β1) stimulují syntézu ECM, proliferaci buněk a uvolňování retinoidů z HSC. Hepatocyty a Kupfferovy buňky jsou též zdrojem reaktivních forem kyslíku, které stimulují HSC. *In vitro* oxidační stres zvyšuje proliferaci a syntézu kolagenu. Kromě okolních buněk se v časné fázi aktivace HSC uplatňuje i ECM, která je zásobárnou růstových faktorů (Friedman, 2008).

Druhá fáze aktivace je označována jako perpetuace. HSC ztrácejí schopnost skladovat vitamin A. Zda je aktivace HSC podmíněná úbytkem retinolu z plazmy není v současnosti zcela objasněno.

Během iniciace dochází ke zvýšené syntéze PDGF receptorů na povrchu HSC. V perpetuaci dochází k proliferaci HSC pod vlivem autokrinně produkovaného PDGF (Friedman, 2000). Mezi další mitogeny ovlivňující proliferaci patří vaskulární a endotelový růstový faktor (VEGF) (Yoshiji a spol., 2003), trombin, EGF, TGF-α a FGF-2 (Bataller a Brenner, 2005).

Během perpetuace dochází k masivní fibrogenezi, zvýšené produkci patologické ECM. Jak již bylo zmíněno, nejvýznamnějším cytokinem fibrogeneze je TGF-β1, který je secernován autokrinně i parakrinně. Účastní se aktivace zánětlivých buněk, přeměny ECM a ovlivňuje i aktivitu fibroblastů. Potencuje tvorbu kolagenních i nekolagenních složek ECM (Gressner a Weiskirchen, 2006).

Aktivované HSC jsou charakteristické expresí α-SMA. Díky α-SMA mají buňky schopnost kontrakce, která umožňuje zmenšení plochy poraněné tkáně

(Rockey a spol., 1993). Kontrakcí výběžků, které obepínají sinusoidy, je blokován tok krve v sinusoidách, což je jedna z příčin portální hypertenze (Bataller a Brenner 2005).

Aktivované HSC produkují cytokiny TGF-α a EGF, 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).

K aktivaci HSC nedochází bezprostředně po poškození jater. Počet aktivovaných HSC koreluje s dobou, po kterou přetrvává poškození. Při kultivaci *in vitro* dochází k aktivaci HSC za 5 – 7 dní, a to jak při kultivaci na plastu (Jiroutová a spol., 2005), tak při kultivaci na kolagenním gelu typu I (Sato a spol., 2003).

#### 4.4.1.3. Zánik aktivovaných HSC

V průběhu akutního hojení se počet aktivovaných HSC snižuje. Ke snížení stavu aktivovaných HSC vedou dvě cesty apoptóza nebo návrat do klidového stavu. Molekuly CD95 L (Fas ligand), Bcl-2 a p53 indukují v HSC intracelulární apoptické mechanismy. Aktivované HSC exprimují Fas receptor i Fast ligand, díky čemuž mohou podléhat autokrinní indukci apoptózy (Friedman 2000). TIMP-1 inhibuje apoptózu HSC prostřednictvím inhibice MMP (Murphy a spol., 2002).

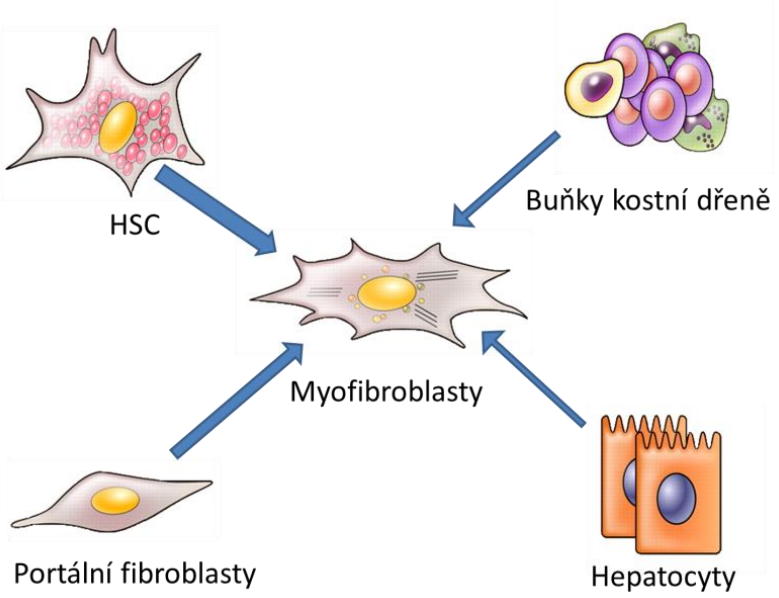
Při návratu do klidového stavu se uplatňuje IL-10, který je produkován makrofágy. Odpověď na otázku, které aktivované HSC se navrátí do klidového stavu, a které podlehnou apoptóze, není v současnosti zcela známa.

### 4.4.2. MYOFIBROBLASTY

HSC spolu s portálními fibroblasty a v malé míře i hepatocyty jsou zdrojem buněk myofibroblastického fenotypu. Všechny zdroje jsou uvedeny na obrázku č. 5. Fibroblasty i HSC po aktivaci mění svůj fenotyp. 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. Třetí subpopulací jsou tzv. interface MFB, které se nacházejí v oblasti mezi parenchymem a stromatem portálních polí nebo sept.

Rozlišení MFB od HSC je možné díky základním cytoskeletárním proteinům. Pro klasifikaci se nejčastěji používají vimentin, desmin, fibulin-2, GFAP a α-SMA (Mermall a spol., 1998). MFB jsou charakteristické expresí α-SMA a fibulinu 2. zatím co HSC jsou pozitivní na desmin a GFAP (Ramadori a Saile 2002, Jiroutová a spol., 2007).




**Obrázek č. 5: Zdroje myofibroblastů v jaterní tkáni (upraveno z Friedman 2007)**

## 4.5. RŮSTOVÉ FAKTORY MODULUJÍCÍ BUNĚČNÝ FENOTYP

### 4.5.1. TGF-β1

Rodina růstových faktorů TGF-β je prezentována více než čtyřiceti signálními proteiny (Tandon a spol., 2010). Členové této rodiny modulují širokou řadu biologických procesů včetně buněčné proliferace, diferenciace, syntézy

extracelulární matrix (ECM), migrace a apoptózy. Hrají hlavní roli během prenatálního vývoje a v postnatální remodelaci a růstu různých tkání a orgánů. TGF- β je u savců přítomen ve třech izoformách, které jsou kódovány různými geny na různých chromozomech. TGF-β1 izoforma je silně exprimována při nemocech charakterizovaných fibrózou.

Všechny tři izoformy jsou vylučovány mnoha typy buněk jako biologicky inaktivní agregáty, tzv. malé latentní komplexy (SLC). SLC se skládají z TGF-β a z latentního peptidu LAP-1. LAP-1 zůstává nekovalentně spojen s TGF-β1 a tvoří neaktivní komplex, dokud nezmění svojí konformaci nebo nedojde k proteolýze. V některých případech může z SLC vznikat velký latentní komplex (LLC). LLC navíc obsahuje protein vázající latentní TGF-β (LTBP-1) (Oklü a spol., 2011). LTBP-1 je produktem jiného genu pro TGF-β1 a usnadňuje sekreci TGF-β1 z buňky. Secernovaný LTBP-1 se váže na povrch buněk a ECM. Asociace latentního TGF-β1s buňkami a ECM zprostředkovaná LTBP-1 může sloužit k extracelulárnímu uložení TGF-β1. Z komplexu může být TGF-β1 v případě potřeby uvolněn plasminem (Khalil a spol., 2001).

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- β1. Receptor typu III je tvořen transmembránovým betaglykanem (Lambert a spol., 2011). Receptory tvoří homo i heterodimery. Po vytvoření komplexu TGF- β1 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-β1 je nejsilnějším doposud známým inhibitorem růstu a proliferace pro normální i nádorově modifikované epitelové buňky (Allington a Schiemann 2011), endotelové buňky, fibroblasty, nervové buňky, hepatocyty, keratinocyty aj. Rozsah inhibice růstu vyvolané TGF- β1 závisí na typu buněk a koncentraci TGF- β1 a přítomnosti dalších faktorů (Tandon a spol., 2010). Zajímavou

skutečností je fakt, že při nízkých koncentracích TGF- β1 je inhibován růst buněk hladké svaloviny, fibroblastů a chondrocytů. Při vyšší koncentraci ale dochází k opačnému jevu, a to ke stimulaci těchto buněk. Tento jev je částečně zprostředkována PDGF, který je silným mitogenem pro buňky mezenchymálního původu. Syntéza a sekrece PDGF je stimulována nízkou koncentrací TGF-β1 a naopak vyšší koncentrace TGF-β1 má za následek sníženou expresi PDGF (Keskiner 2016).

TGF-β1 hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu. Stimuluje expresi proteinů p21 a p15, které zastavují buňku v G1 fázi cyklu a za určitých podmínek indukuje apoptózu (Allington a Schielmann 2011).

TGF-β1 lze považovat za hlavní profibrogenní cytokin. Pod jeho vlivem dochází k aktivaci HSC a fibroblastů na myofibroblasty. TGF- β1 indukuje expresi SMA-α ve fibroblastických buňkách různého původu (Malmström et al., 2004, Meyer-terc-Vehn et al., 2006, Hinz 2007). Vyšší hladiny TGF-β1 indukují 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-β1 podporuje hromadění FN-EDA izoformy (Muro a spol., 2007, Serini a spol., 1998).

### 4.5.2. RŮSTOVÉ FAKTORY FIBROBLASTŮ FGF

#### 4.5.2.1. FGF super rodina

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).

FGF byly poprvé izolovány z hypofýzy skotu jako mitogeny, které by mohly stimulovat růst buněk. Ačkoliv byly FGF původně pojmenovány díky svým účinkům na fibroblasty, některé z nich vůbec růst fibroblastů nevyvolávají.

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 zesiluje signál v buňce (Ornitz 2000).

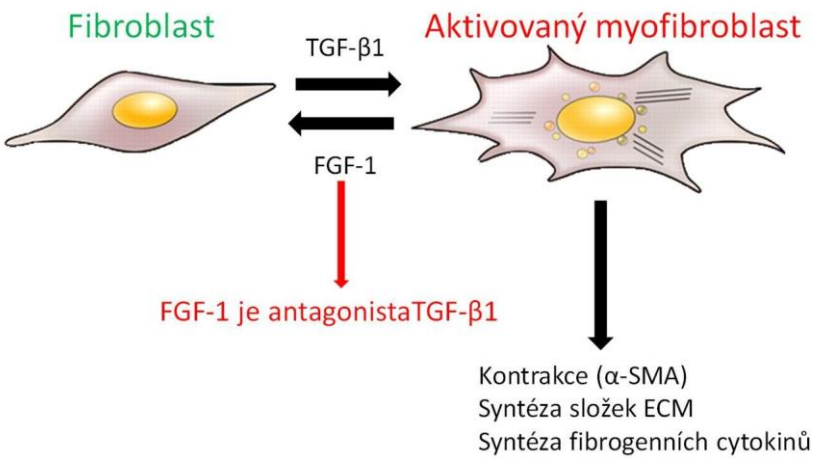
FGFR jsou povrchově vázané tyrozinkinázové receptory. Extracelulární část obsahuje, tři imunoglobulinům podobné domény a heparin vázající doménu. Dále obsahuje transmembránovou doménu a intracelulární doménu s tyrozinkinásovou aktivitou. Specifita receptoru pro různé typy FGF je dána alternativním sestřihem 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. Významným rysem FGFR je schopnost křížové reaktivity mezi těmito receptory a jejich ligandy. Extracelulární doména určuje vazebnou specifitu a zprostředkovává ligandem indukovanou dimerizaci receptoru, nezbytnou pro FGF signalizaci (Schlessinger a spol., 2000).

#### 4.5.2.2. FGF-1

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 a spol., 2001). FGF-1

působí jako antagonista TGF-β1, 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 u knockoutovaných myší postrádajících geny pro oba faktory FGF-1 i FGF-2 klesá fibrotická reakce (Yu a spol., 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.




**Obrázek č. 6: Vliv růstových faktorů FGF-1 a TGF-β1 na změnu fenotypu buněk.**

# 5. METODICKÁ ČÁST

## 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 MYOFIBROBLASTŮ

### 5.2.1. Perfuze

Játra byla postupně promývána Hanksovým roztokem bez vápníku (HBBS(-)), 0,2% roztokem pronázy (Roche) a 0,01% roztokem kolagenázy (Roche) v Hanksově roztoku obsahujícím vápník (HBBS (+)). pH roztoků bylo upraveno roztokem 0,5M sodné soli HEPES. Průtok roztoků během perfuze byl nastaven na 10 ml/min. Perfuze byla ukončena v okamžiku, kdy z konzistence jater bylo patrné, že struktura jaterních laloků je rozrušena. Teplota jater byla během celé perfuze udržována na 37°C pomocí lampy se 100 W žárovkou. Teplota byla měřena digitálním teploměrem vsunutým pod játra.

### 5.2.2. Izolace buněk

Buněčná suspenze byla inkubována s 0,001% roztokem DNázy (Roche). K izolaci bylo využito centrifugační médium Optiprep (Sigma-Aldrich). Ve zkumavce byla navrstvena nejprve buněčná suspenze v 17% Optiprepu a poté vrstva 11,5% Optiprepu v HBSS (+) a nakonec bylo vše převrstveno HBSS (+)Vrstva vytvořena na rozhraní 11,5% Optiprepu a HBSS (+) obsahuje neparenchymovou frakci jaterních buněk obohacenou o HSC. Buňky byly kultivovány v 0,1% kolagenním gelu a na plastu při standardních podmínkách. Jak je popsáno dále.

## 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. Kultivace probíhala v atmosféře 5 % $CO_2$ a při vlhkosti 85 %. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Biowest) s přídavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS, Biowest). Po 24 hodinové kultivaci byl přidán FGF-1 (Peprotech) a heparin (Sigma-Aldrich) popř. inhibitory SB431542 (100 nmol/ml, Sigma-Aldrich) nebo UO126 (30 nmol/ml, Cell Signaling). Doba kultivace i koncentrace FGF-1 jsou uvedeny ve výsledkové části. Konetraci heparinu (10 µg/ml) jsme vybrali z literatury (La Vallee a spol. 1998).

Jaterní HSC byly získány z neparenchymové frakce jaterních buněk. Buňky byly kultivovány při standardních podmínkách (DMEM, 10% FBS, 5 % $CO_2$, vlhkost 85 a 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). Buňky byly kultivovány za standardních podmínek (DMEM, 10% FBS, 5 % $CO_2$, vlhkost 85 %). 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

Ocasní šlachy byly získávány z padesátidenních potkanů. Kolagen typu I byl extrahován 0,25M kyselinou octovou při 4°C, dialyzován oproti 0,02M kyselině octové a naředěn na výslednou koncentraci 1,33 mg/ml. Pro dlouhodobé skladování byl roztok kolagenu zamrazen na -70°C.

Při přípravě gelu byl roztok kolagenu v kyselině octové smíchán s 4x DMEM v poměru 3:1. V tomto roztoku byly rozsuspendovány buňky, 2 ml

roztoku byly přeneseny na plastové misky (8 $cm^2$). Po polymeraci byl gel převrstven 1,5 ml média s 10% FBS.

## 5.5. IZOLACE RNA

Buněčná membrána MFB byla lyzována guanidinthiokyanátem. Buňky kultivované v kolagenním gelu byly lyzovány i s gelem, bez použití enzymů. RNA z lyzátů byla extrahována fenol-chloroformovou metodou (Chomczynsky 1987). Čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky měřením 260/280 nm. V případě potřeby byla RNA přečištěna na kolonách Nucleospin® RNA XS (Macherey-Nagel). Izolace RNA z potkaních HSC probíhala podle stejného postupu.

HSC-T6 kultivované na plastu byly po seškrabání z Petriho misek třikrát promyty PBS a lyzovány RLT pufrem (součást RNeasy Mini Kitu, Qiagen). Kolagenní gel byl rozpuštěn kolagenasou NB Proved Grade z *Clostridium histolyticum* (Serva). Po promytí PBS s přídavkem EDTA byly buňky lyzovány RLT pufrem. Celková RNA byla izolována kitem RNeasy Mini Kit podle instrukcí výrobce.

## 5.6. REVERZNÍ TRANSKRIPCE A qPCR

Vyizolovaná RNA byla pomocí kitu High-Capacity cDNA Archive Kit s náhodnými primery (Applied Biosystems) převedena na cDNA. 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). Sledované geny se specifikací jsou uvedeny v tabulce č. 2. Při stanovení jsme postupovali dle pokynů výrobce. Exprese genů byla normalizována na 18S RNA.

| Gen | Katalogové číslo |
|---|---|
| **18S RNA** | Hs03003631_g1 |
| **Acta 1** | Rn01641150_m1 |
| **Desmin** | Rn00574732_m1 |
| **Fbln2** | Rn01425962_m1 |
| **Fndc3a** | Rn01465936_m1 |
| **MMP-14** | Rn00579172_m1 |
| **MMP-2** | Rn01538171_m1 |
| **MMP-9** | Rn00579162_m1 |
| **Prokolagen I alfa 2** | Rn00584426_m1 |
| **Prokolagen IV alfa 1** | Rn01482925_m1 |
| **Reelin** | Rn01442363_m1 |
| **SMAD 3** | Rn00565331_m1 |
| **TGF-β1** | Rn00572010_m1 |
| **TIMP-1** | Rn00587558_m1 |
| **TIMP-2** | Rn00573232_m1 |
| **TIMP-3** | Rn00441826_m1 |
| **VEGF** | Rn00582935_m1 |

**Tabulka č. 2: Katalogová čísla Taqman gene expression assay**

## 5.7. WESTERN BLOT

Buňky byly z plastových Petriho misek seškrabány a třikrát promyty PBS. Kolagenní gel byl degradován kolagenázou NB Proved Grade z *Clostridium histolyticum* (Serva) a buňky byly třikrát promyty PBS s přídavkem EDTA. Proteiny byly extrahovány lyzačním pufrem (Cell Signaling). Obsah proteinu v lyzátu byl stanoven spektrofotometricky s využitím Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich). Nanášky proteinu se pohybovaly v rozmezí 10 – 30 µg na jamku. Elektroforéza probíhala na gradientových gelech Novex NuPAGE4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen Life technologies) za neredukčních podmínek. Proteiny byly přeneseny na 0,2 µm nitrocelulosovou membránu Hybond (GE Healthcare). Jako kontrola nanášky bylo použito barvení membrány Poceau S. Membrány byly inkubovány s primárními protilátkami přes noc při 4°C (tab. č. 3) Sekundární protilátky byly zakoupeny od firmy Santa-Cruz. Detekce byla provedena luminolem (Santa-Cruz). Snímky byly naskenovány, kvantifikovány programem QUANTITY ONE 4.6 (Bio-Rad).

| Primární protilátka | Klon | Typ protilátky | Výrobce | Ředění |
|---|---|---|---|---|
| **Anti-EDA-FN** | IST-9 | monoklonální | Santa-Cruz | 1:200 |
| **Anti-MMP2** | H-76 | polyklonální | Santa-Cruz | 1:250 |
| **Anti-p-Smad2/3** | D27F4 | monoklonální | Cell Signaling | 1:1000 |
| **Anti-Smad2/3** | D7G7 | monoklonální | Cell Signaling | 1:1000 |
| **Anti-TGFβ1** | V | polyklonální | Santa-Cruz | 1:100 |
| **Anti-TIMP1** | R-17 | polyklonální | Santa-Cruz | 1:100 |
| **Anti-αSMA** | 1A4 | monoklonální | Sigma-Aldrich | 1:500 |

**Tabulka č. 3: Přehled použitých primárních protilátek**

## 5.8. IMUNOCYTOCHEMIE

MFB a HSC byly kultivovány po dobu 24 hodin, poté byl přidán FGF-1 s heparinem a inhibitor SB431542. Po 72 hodinách byly buňky zafixovány paraformaldehydem a permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100.

HSC-T6 byly kultivovány po dobu 24 hodin, poté bylo médium vyměněno za bezsérové a byl přidán TGF-β1. Po 24 hodinové kultivaci byly přidány FGF-1/H nebo FGF-1/H v kombinaci s TGF-β1. Buňky zafixovány paraformaldehydem a permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100.

Nespecifické vazby byly 30 minut blokovány 1% FBS. Fixované preparáty byly inkubovány s protilátkou proti α-SMA (Mouse monoclonal Anti-Actin α-Smooth Muscle antibody clone 1A4; Sigma-Aldrich) při 4°C přes noc. Jako sekundární protilátka byly použity polyklonnální kozí anti-myší imunoglobuliny značené křenovou peroxidasou (Dako). Jádra byla obarvena DAPI. K prodloužení fluorescence preparátů bylo požito Vectashield mounting medium for fluorescence H-1000 (Vector).

## 5.9. ZYMOGRAFIE

Aktivita želatináz byla měřena v médiu. MFB byly kultivovány na kolagenním gelu i na plastu po dobu 24 hodin. Poté byly trypsinizovány a přesazeny na plastové misky do bez sérového média. Po 24 hodinové kultivaci s FGF-1 a heparinem bylo odsáto médium.

HSC-T6 byly vysazeny na kolagenní gel a plast. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za bez sérové a byl přidán TGF-β1 na 24 hodin. Poté byly

buňky trypsinovány a přesazeny opět do bez sérového média s přídavkem FGF-1, heparinem a TFG-β1 na plastové misky. Po 24 hodinách bylo odsáto médium.

Obsah proteinů v médiu byl stanoven spektrofotometricky s využitím Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich). Vzorky byly elektroforeticky rozděleny na 8% SDS-polyakrylamidovém gelu s obsahem 0,1% želatiny. Nanáška vzorků byla 5 mg na jamku pro MFB a 30 mg na jamku pro HSC-T6. Gel byl dvakrát promyt po dobu 30 minut 2,5% roztokem Tritonu X-100. Následně byl gel inkubován v inkubačním pufru (50 mM Tris-HCl, 15 mM chlorid sodný, 10 mM chlorid vápenatý, pH 7,4) po dobu 16 hodin. Gel byl obarven Comassie blue a odbarven (10% kyselina octová, 40% methanol).

## 5.10. ELISA

Hladiny extracelulárního TGF-β1 byly stanoveny v médiu s použitím komerčních ELISA kitů (Invitrogen Life Technologies) podle instrukcí výrobce. Buňky byly kultivovány na plastu a na kolagenních gelech po dobu 24 hodin poté bylo přidáno FGF-1, heparin a inhibitory SB431542 a UO126. Doba působení je uvedena v tabulce a v grafech. Minimální detekovatelné množství TGF- β1 je méně než 15,6 pg/ml. Celkové množství TGF- β1 bylo normalizováno na počet buněk a objem média.

## 5.11. STANOVENÍ DNA

MFB byly kultivovány standardním způsobem na plastu i v kolagenním gelu. Časové intervaly kultivace s FGF-1/H jsou uvedeny ve výsledkové části. MFB byly z plastových Petriho misek seškrabány a třikrát promyty PBS. Kolagenní gel byl degradován kolagenázou a buňky byly třikrát promyty PBS s přídavkem EDTA. Buňky byly lyzovány 5% kyselinou chloristou po dobu 30 minut při 70°C. K hydrolyzátu byl přidán difenylamin a acetaldehyd. Směs byla inkubována do druhého dne ve tmě při pokojové teplotě. Obsah DNA byl stanoven spektrofotometricky. Celkové množství bylo normalizováno na počet buněk.

## 5.12. WST-1 TEST

MFB byly kultivovány na plastu a v kolagenním gelu standardním způsobem v uspořádání na 96-ti jamkové desce. Po uplynutí jednotlivých časových intervalů bylo do jamek přidáno Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche). Desky byly inkubovány 2 hodiny při 37°C, 5% $CO_2$ a 85% vlhkosti. Proliferace byla stanovena spektrofotometricky a byla normalizována na počet vysazených buněk.

## 5.13. STATISTICKÁ ANALÝZA

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

# 6. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

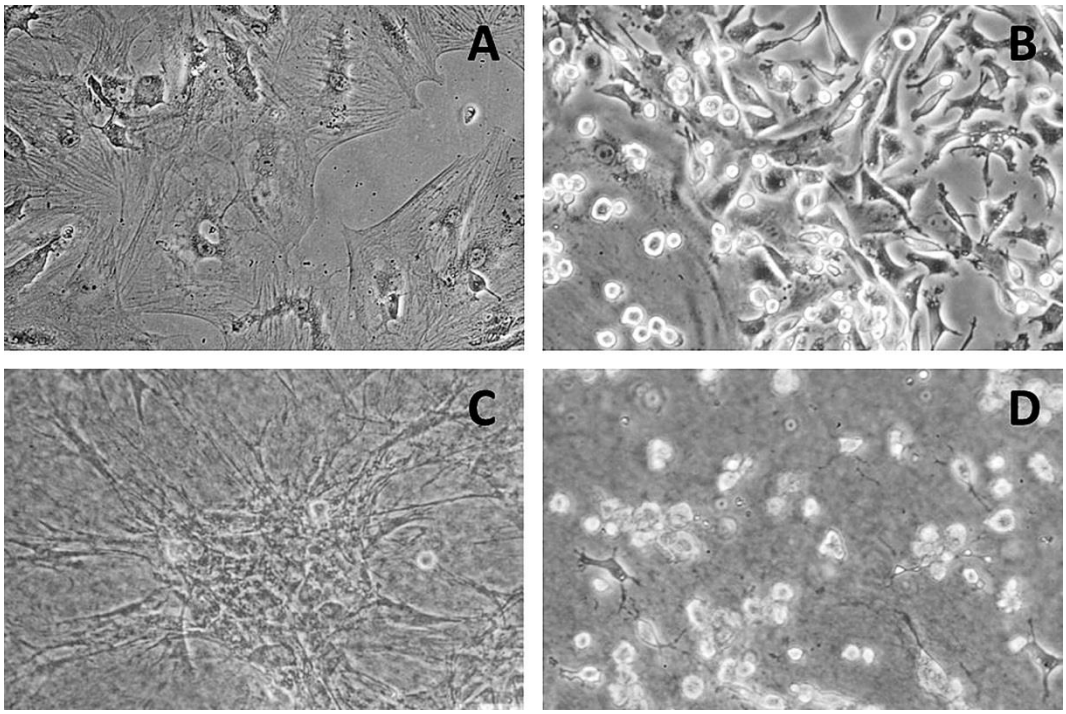
V první části této práce jsme sledovali vliv kultivačního prostředí a FGF-1/H na primokulturu jaterních MFB, které jsme získali z neparenchymové frakce jaterních buněk potkanů (kmen Sprague-Dawley). V druhé části jsme se zaměřili na vliv kultivačního prostředí a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6.

## 6.1. VLIV RŮSTOVÉHO FAKTORU FIBROBLASTŮ FGF-1 NA JATERNÍ MYOFIBROBLASTY *IN VITRO*

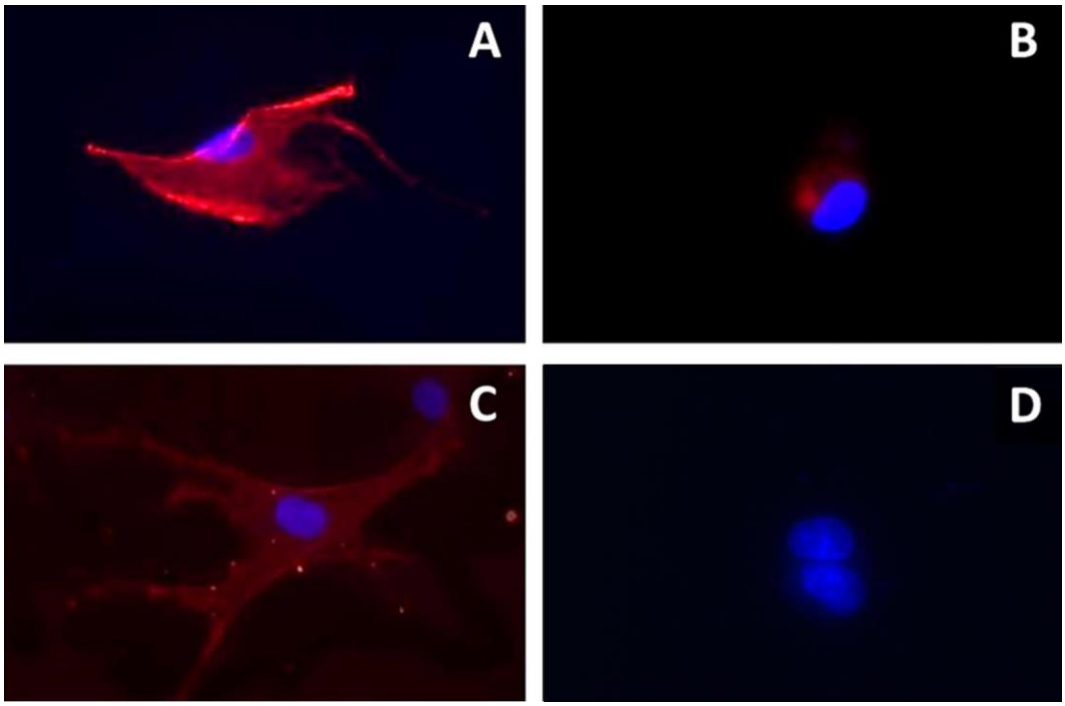
### 6.1.1. CHARAKTERIZACE BUNĚK NA ZÁKLADĚ MORFOLOGIE A EXPRESE α-SMA

Před začátkem vlastního studia vlivu kolagenního gelu a FGF-1/H bylo nezbytné charakterizovat fenotyp buněk. Porovnávali jsme fenotyp MFB získaných opakovaným pasážováním primokultury HSC s HSC po dvoudenní kultivaci, které ještě mají klidový fenotyp.

Rozdíly mezi buňkami jsou patrné již na jejich morfologii. Obr. č. 7 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. 8 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. 8 C). HSC kultivované na plastu mají dlaždicový tvar bez viditelných stresových vláken α-SMA (Obr. č. B). HSC v kolagenním gelu netvoří shluky jako MFB. Mají malá kulatá těla bez cytoplazmatických výběžků (Obr. č. 7 D) a stresových vláken α-SMA (Obr. č. 8 D).



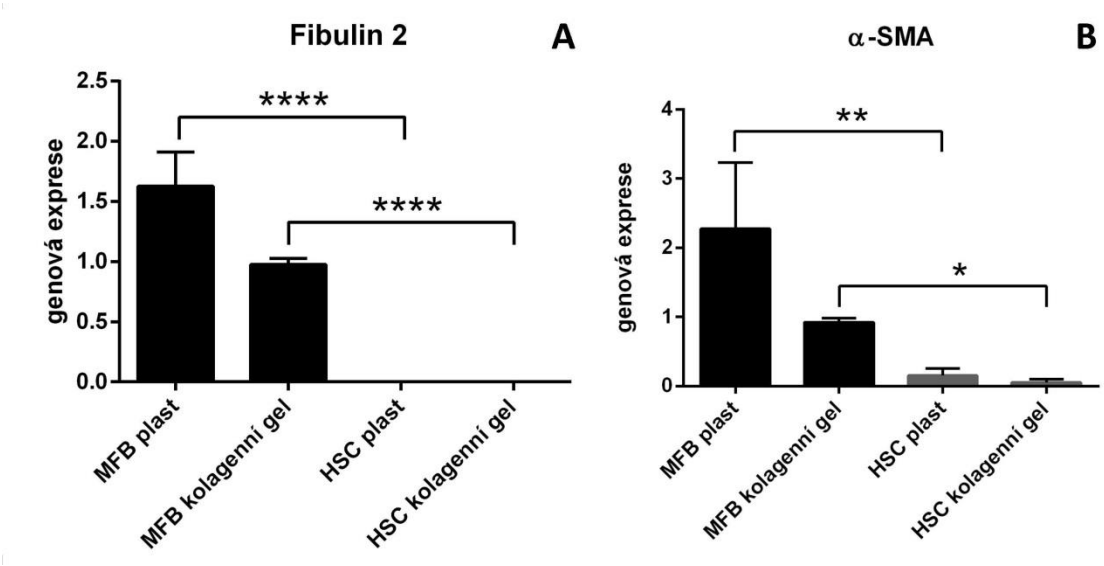

**Obrázek č. 7 Jaterní MFB kultivované na plastu (A) a v kolagenním gelu (C) 48 hodin po vysazení, zvětšení 100x. Jaterní HSC kultivované na plastu (B) a v kolagenním gelu (D) 48 hodin po vysazení, zvětšení 100x.**



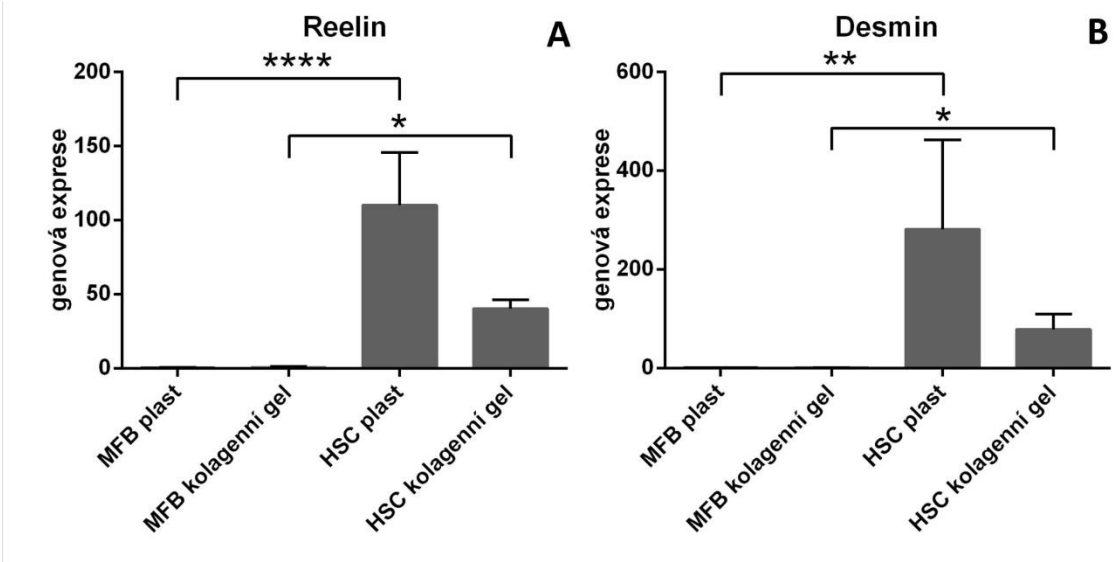

**Obrázek č. 8 Imunocytochemické barvení α-SMA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (C) a HSC na plastu (B) a v kolagenním gelu (D) 48 hodin po vysazení, zvětšení 1000x**

### 6.1.2. CHARAKTERIZACE BUNĚK NA ZÁKLADĚ EXPRESE GENŮ MFB FENOTYPU

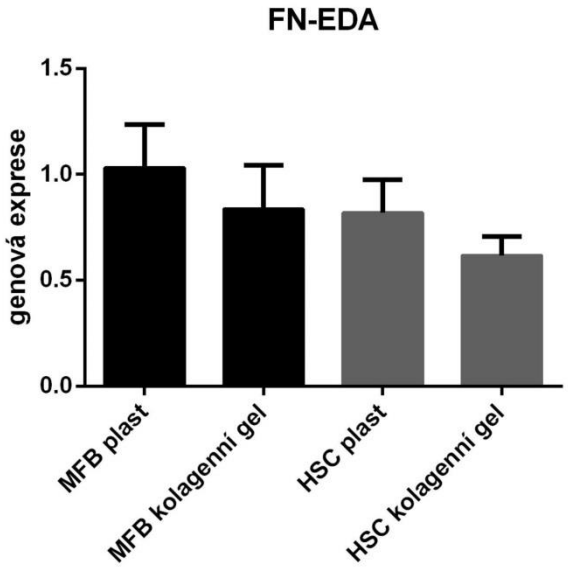
Pro charakterizaci buněk jsme vybrali markery typické pro MFB fenotyp (fibulin-2, α-SMA), pro klidové HSC buňky (desmin, reelin) a FN-EDA nezbytný pro diferenciaci fibroblastů. Jejich exprese jsme sledovali na úrovni mRNA. Opakovaně pasážované buňky silně exprimovaly Fibulin-2 (Graf č.1 A) a α-SMA (Graf č.1 B). Exprese reelinu (Graf č. 2 A) a desminu (Graf č. 2 B) byla naopak zvýšená v HSC po dvoudenní kultivaci. FN-EDA byl exprimován v obou typech buněk. Z grafů vyplývá, že čtyřikrát pasážovaná frakce neparenchymových jaterních buněk má myofibroblastický fenotyp. Kultivace buněk v kolagenním gelu expresi genů fibulinu-2 a α-SMA tlumí, ale ne natolik aby získaly fenotyp klidových HSC.




**Graf č. 1: Charakterizace myofibroblastického fenotypu-exprese mRNA markerů MFB, n=4, $p \leq 0,05$**



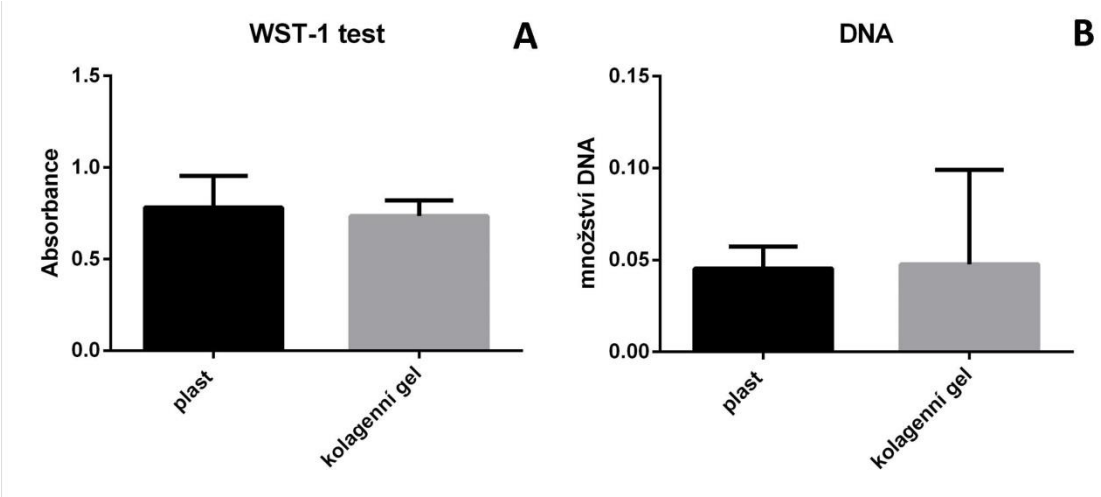

**Graf č. 2: Charakterizace myofibroblastického fenotypu-exprese mRNA markerů klidových HSC, n=4, p ≤ 0,05**




**Graf č. 3: Charakterizace myofibroblastického fenotypu-exprese mRNA FN-EDA, n=4, p ≤ 0,05**

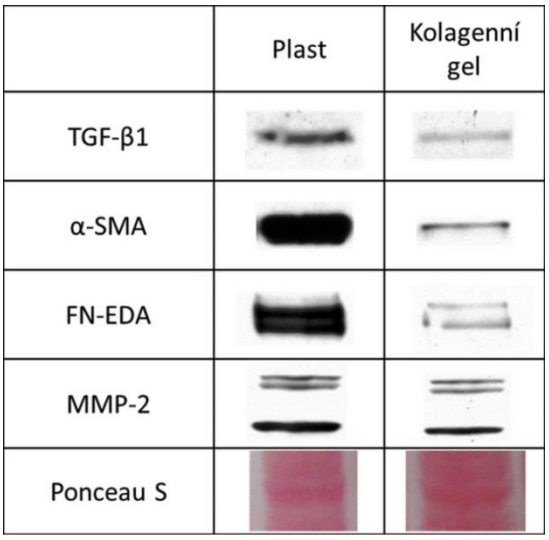
### 6.1.3. VLIV KULTIVAČNÍHO PROSTŘEDÍ NA PROLIFERACI MFB A EXPRESI PROTEINŮ MFB FENOTYPU

Proliferaci na plastu i v kolagenním gelu jsme hodnotili WST-1 testem (graf č. 4A) a stanovením celkové DNA (graf č. 4B). Z grafů plyne, že kultivační prostředí nemá na proliferaci MFB vliv.




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

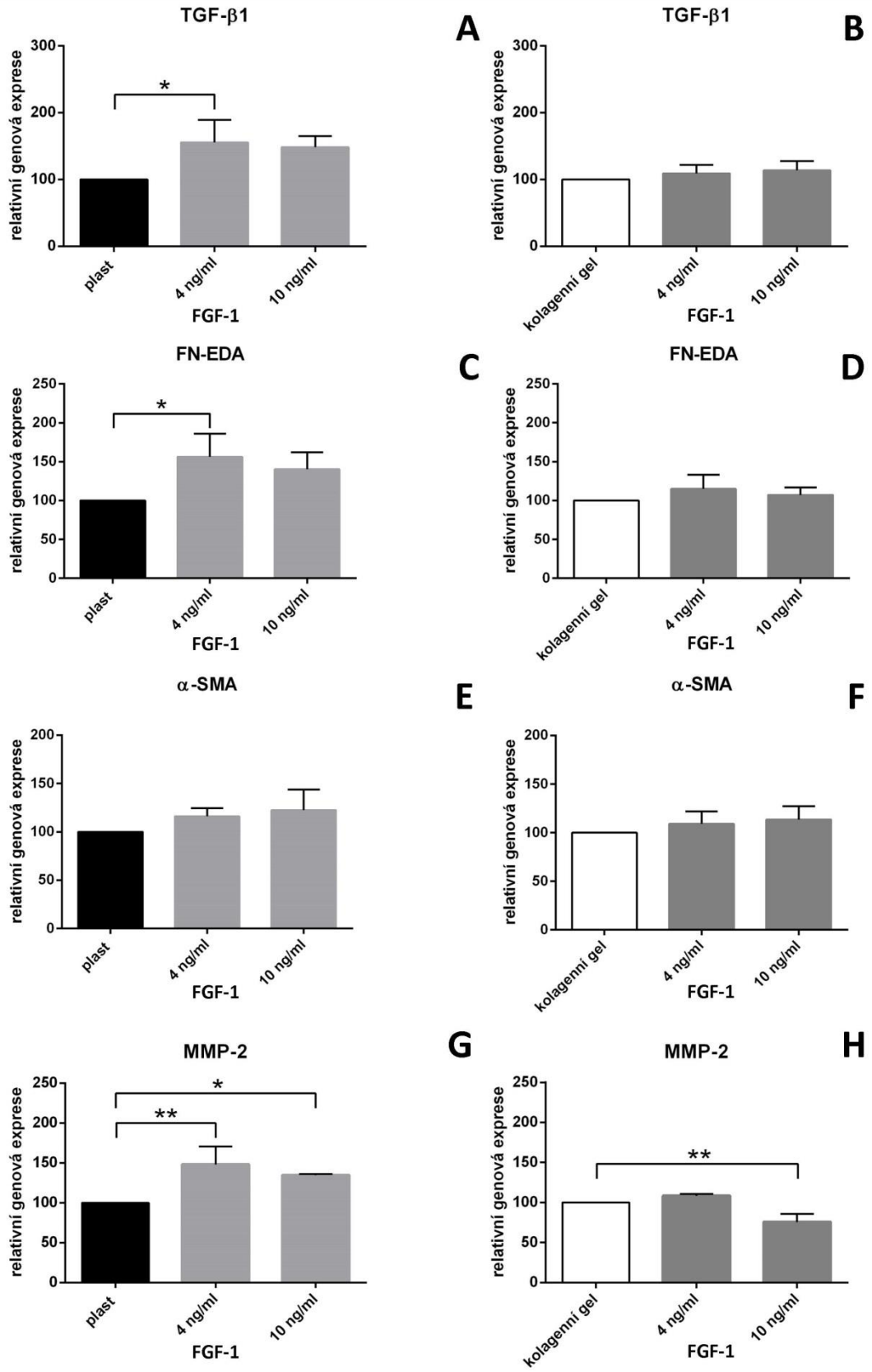
Dále jsme sledovali expresi proteinů typických pro MFB (TGF-β1, α-SMA, FN-EDA) a pro degradaci ECM (MMP-2). K analýze byla použita elektroforéza s westernovým přenosem. Kultivace MFB v kolagenním gelu byla provázena poklesem hladin sledovaných proteinů: TGF-β1 (sníženo 6x), α-SMA (sníženo 3x) a FN-EDA (sníženo 2,5x). Exprese MMP-2 byla snížena jen mírně (Obr. č. 9). Ke kontrole nanášky bylo použito barvení membrány Ponceau S, neboť přenosu buněk do kolagenního gelu dochází ke změně morfologie buněk, při které se mění exprese proteinů běžně používaných při normalizaci western blotů (Jiroutová a spol., 2013).




**Obrázek č. 9: Vliv kultivačního prostředí na expresi markerů MFB – western blot**

### 6.1.4. KONCENTRAČNÍ ŘADA PŮSOBENÍ FGF-1

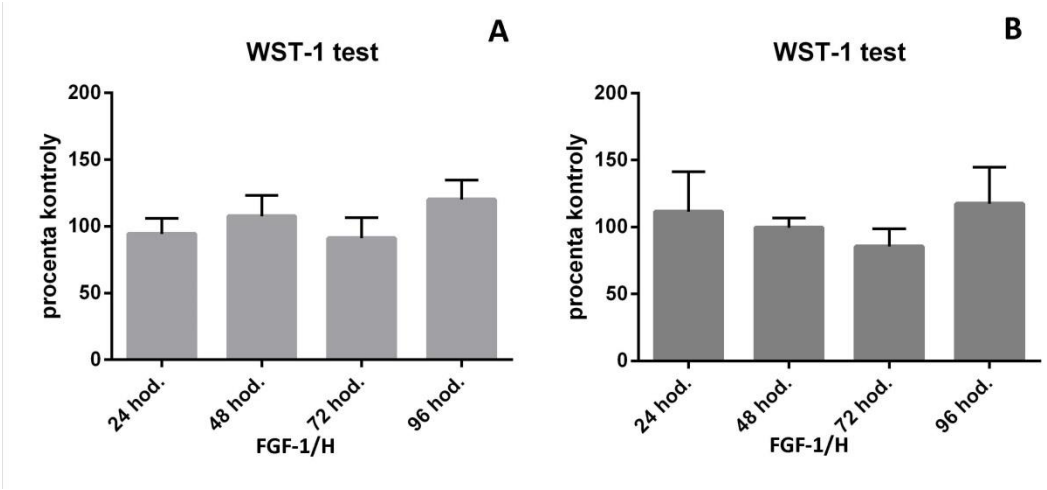
Koncentrace FGF-1 použité při pokusech *in vitro* se podle dostupné literatury pohybují od 1 do 80 ng/ml. V naší práci jsme testovali samotný FGF-1 o koncentracích 4 a 10 ng/ml média s obsahem 0,5% séra (graf č.5). Sledovali jsme expresi genů typických pro MFB (TGF-β1, α-SMA, FN-EDA) a pro degradaci ECM (MMP-2) na úrovni mRNA. Výsledky jsou uvedeny v relativních hodnotách, kdy jako 100 % je brána exprese kontroly bez ovlivnění FGF-1. Z výsledků vyplývá, že nejnižší sledovaná koncentrace 4 ng/ml je účinná, při které dochází k indukci exprese TGF-β1, FN-EDA a MMP-2. Během následujících experimentů jsme dle těchto výsledků používali FGF-1 (4 ng/ml).



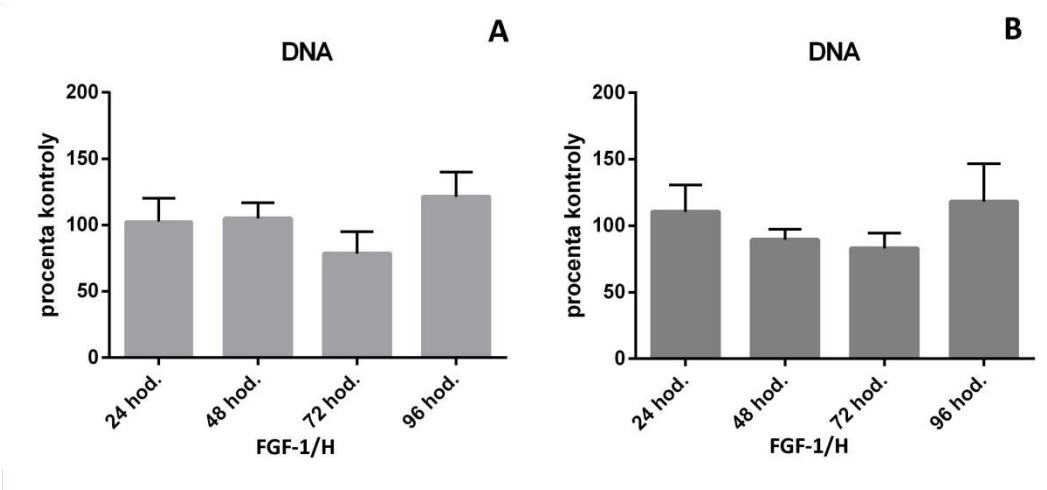

**Graf č. 5: Koncentrační řada FGF-1 – genová exprese markerů MFB na plastu (A, C, E, G) a v kolagenním gelu (B, D, F, H), n=3, $p \leq 0,05$**

### 6.1.5. 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 kultivačních prostředích pomocí WST-1 testu (graf č. 6) a stanovení množství DNA (graf č. 7). FGF-1/H bylo přidáno na časové intervaly v rozmezí 24-96 hodin. Výsledky jsou uvedeny v procentech neovlivněné kontroly v daném časovém intervalu. Z grafů plyne, že FGF-1/H na proliferaci jaterních MFB nemá vliv.



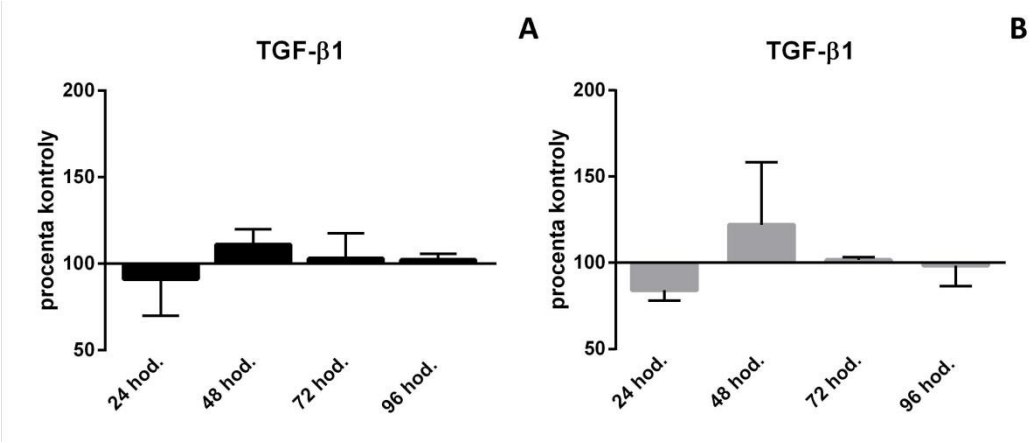

**Graf č. 6: Vliv FGF-1/H na proliferaci buněk v čase na plastu (A) a v kolagenním gelu (B) – WST-1 test, n=3, $p \leq 0,05$**




**Graf č. 7: Vliv FGF-1/H na proliferaci buněk v čase na plastu (A) a v kolagenním gelu (B) – Stanovení DNA, n=3, $p \leq 0,05$**

### 6.1.6. ČASOVÁ KŘIVKA PŮSOBENÍ FGF-1/H NA EXPRESI PROTEINŮ

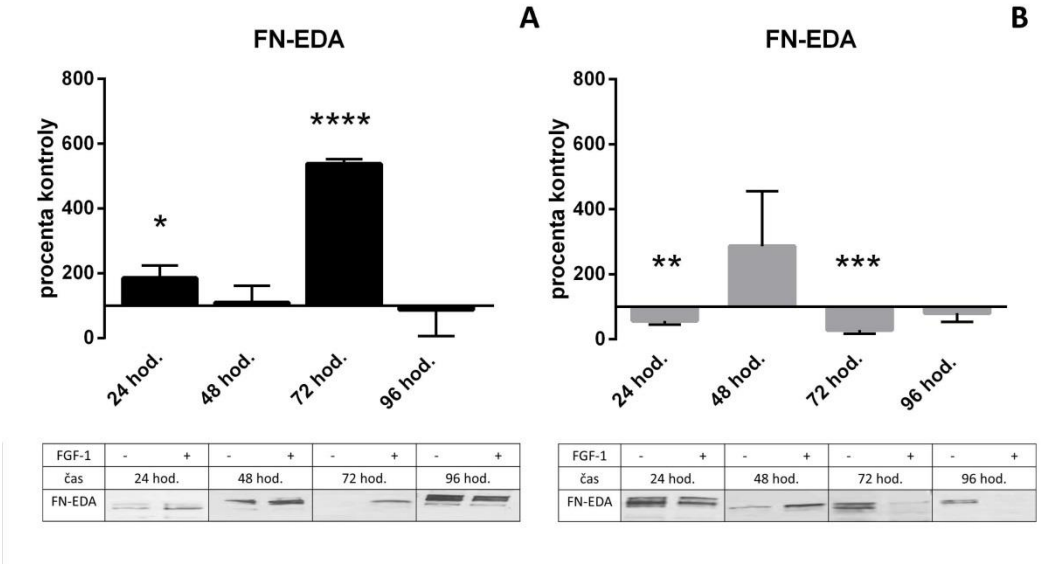
Exprese vybraných proteinů v MFB ovlivněných FGF-1/H po dobu 24, 48, 72 a 92 hodin je uvedena na grafech č. 8-11. Heparin blokuje reverzní transkripci při syntéze cDNA, proto metoda qPCR nebyla použitelná. Protein TGF-β1 byl westernovým přenosem nedetekovatelný, proto jsme ke stanovení extracelulární koncentrace použily metodu ELISA. Zjistili jsme, že hladiny TGF-β1 secernovaného do média se pod vlivem FGF-1/H signifikantně nemění (graf. č 8).



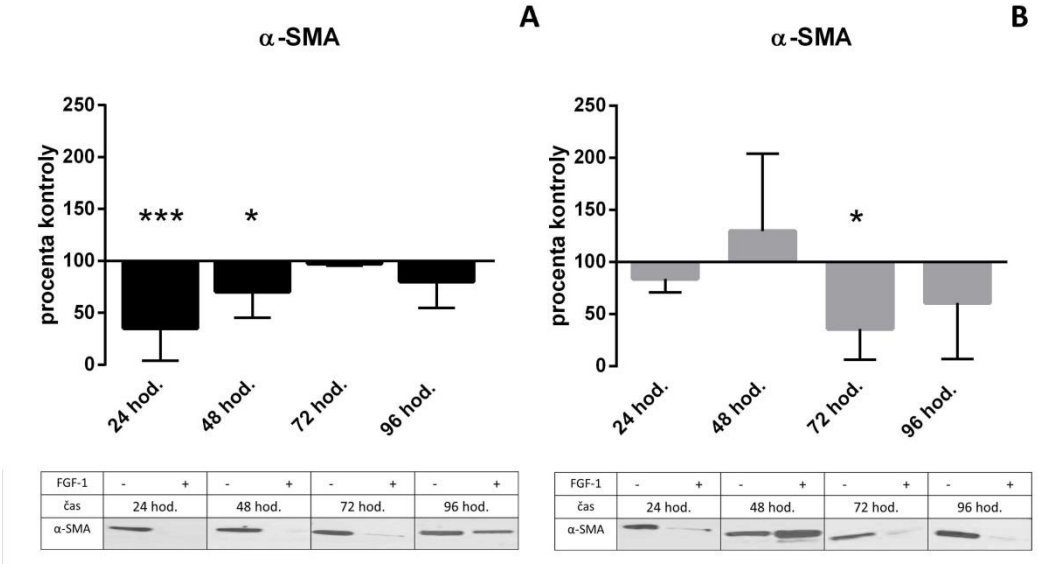

**Graf č. 8: Vliv FGF-1/H v čase na sekreci extracelulárního TGF-β1 do média MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

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 plastu v kolagenním gelu jsou uvedeny v kapitole 6.1.3 obrázek č. 9.

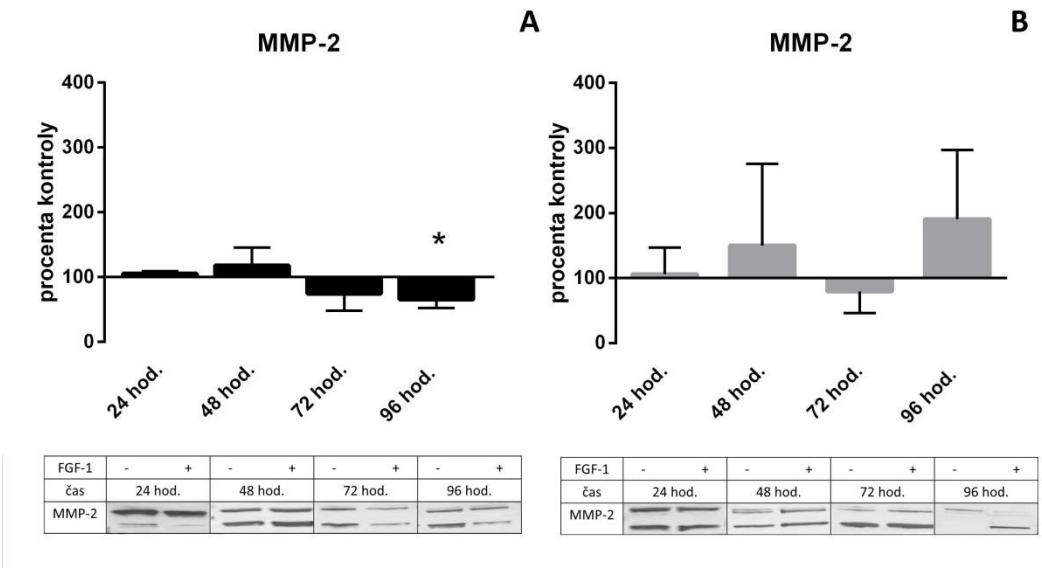
Z výsledků je patrné, že na plastu FGF-1/H zvyšuje během prvních 72 hodin expresi FN-EDA (graf č. 9 A), ale expresi α-SMA snižuje (graf č. 10 A). V buňkách kultivovaných v kolagenním gelu exprese α-SMA (Graf č. 10 B) i FN-EDA (graf č. 9 B) mírně klesaly. Exprese MMP-2 byla pod vlivem FGF-1/H snížena jen v buňkách na plastu po 96 hodinách (graf č. 11 A).




**Graf č. 9: Vliv FGF-1/H v čase na expresi FN-EDA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**



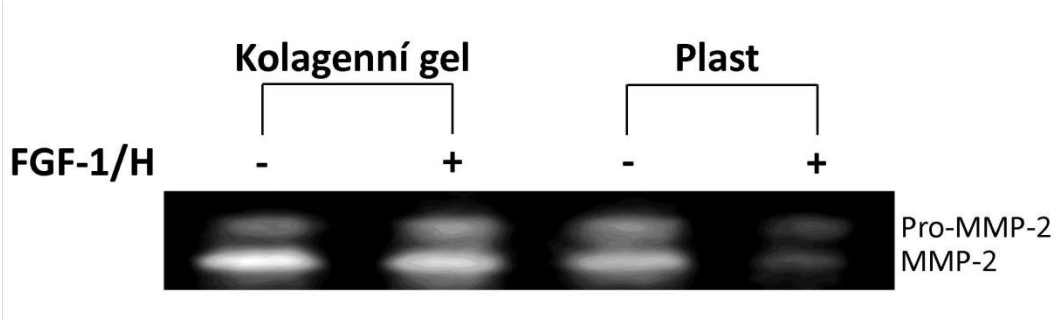

**Graf č. 10: Vliv FGF-1/H v čase na expresi α-SMA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**




**Graf č. 11: Vliv FGF-1/H v čase na expresi α-SMA v MFB na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

### 6.1.7. VLIV FGF-1/H NA AKTIVITU ŽELATINÁZ

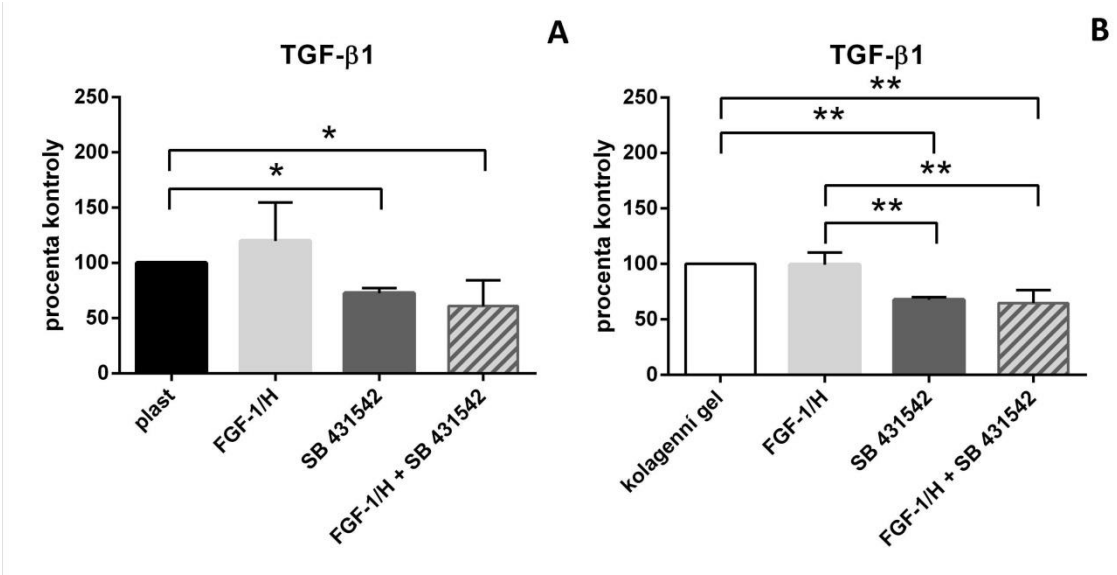
Aktivitu MMP-2, která byla secernována do média buňkami na plastu i v kolagenním gelu, jsme stanovili želatinovou zymografií. Na obrázku č. 10 je reprezentativní fotografie gelu, bílá místa odpovídají aktivitě MMP-2 a pro-MMP-2. Zpracování vzorků (denaturace a opětovná renaturace) umožňuje i inaktivním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



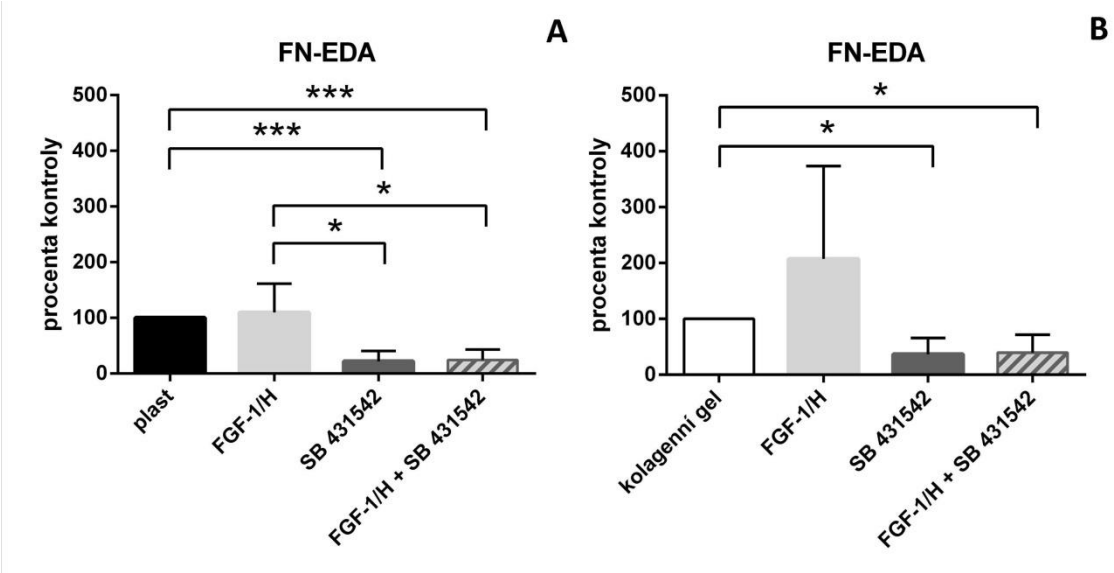

**Obrázek č. 10: Aktivita MMP-2 secernované buňkami na plastu a v kolagenním gelu pod vlivem FGF-1/H, n=3**

### 6.1.8. EXPRESE PROTEINŮ PO INHIBICI TGFR I

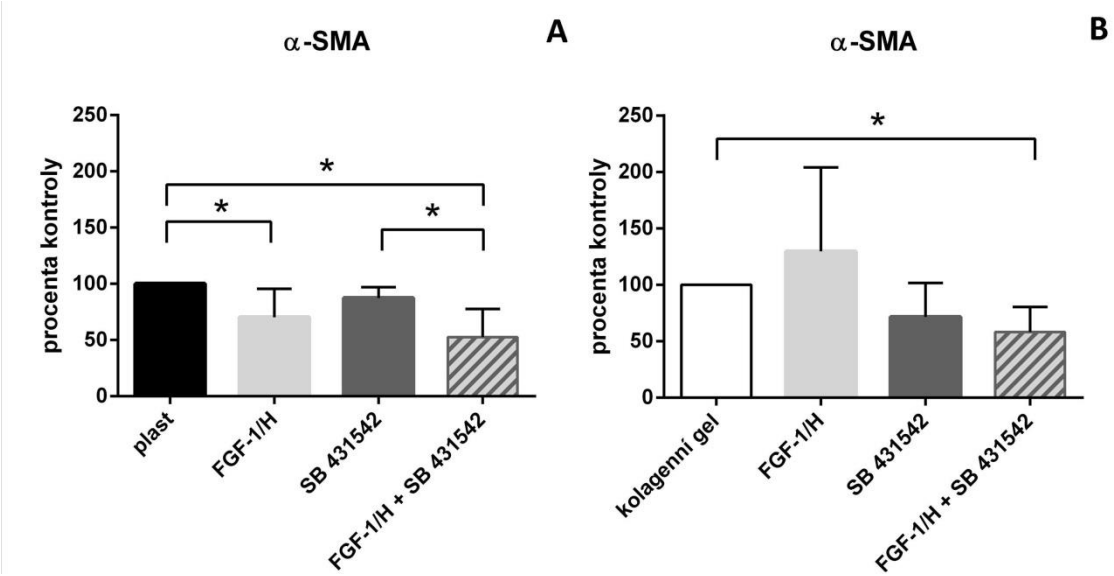
Dle našich zjištění MFB exprimují gen pro TGF-β1. Ke zjištění možné účasti TGF-β1 na stimulaci MFB fenotypu jsme receptor pro TGF-β1 zablokovali inhibitorem SB 431542. FGF-1/H i inhibitor jsme přidávali na dobu 48 hodin. Proteiny α-SMA, FN-EDA a MMP-2 jsme stanovovali elektroforézou s westernovým přenosem a denzitometricky kvantifikovali. Extracelulární TGF-β1 jsme stanovili metodou ELISA. Výsledky jsou uvedeny v procentech příslušné kontroly. Inhibice TGFR I významně snížila sekreci TGF-β1 (graf č. 12 A, B) i expresi FN-EDA (graf č. 13 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. 14 A, B). Exprese MMP-2 nebyla významně ovlivněna.



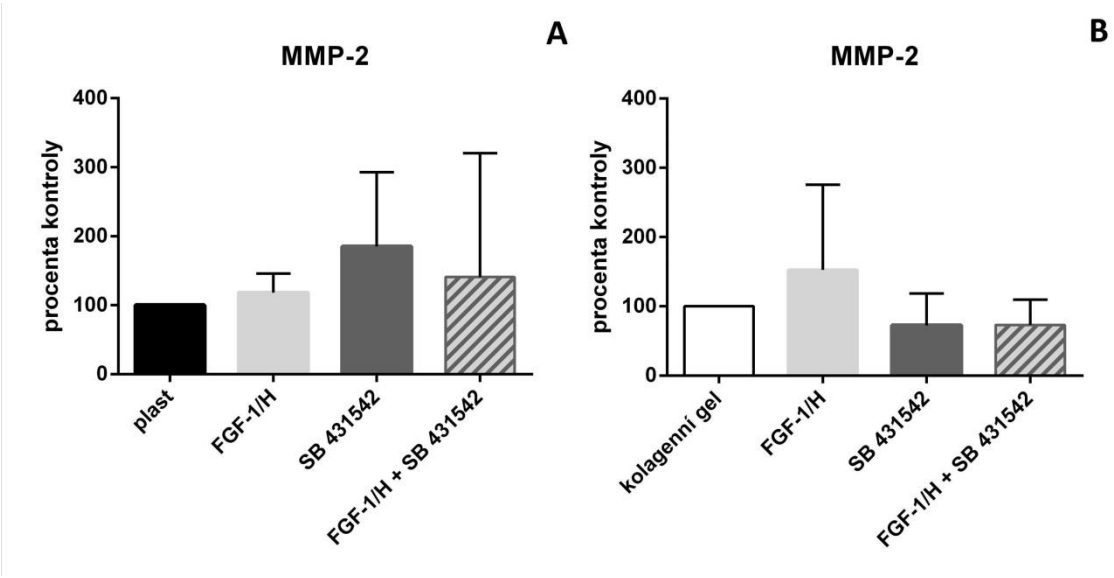

**Graf č. 12: Vliv inhibice TGFR I na sekreci TGF-β1 do média buňkami na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**




**Graf č. 13: Vliv inhibice TGFR I na expresi FN-EDA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

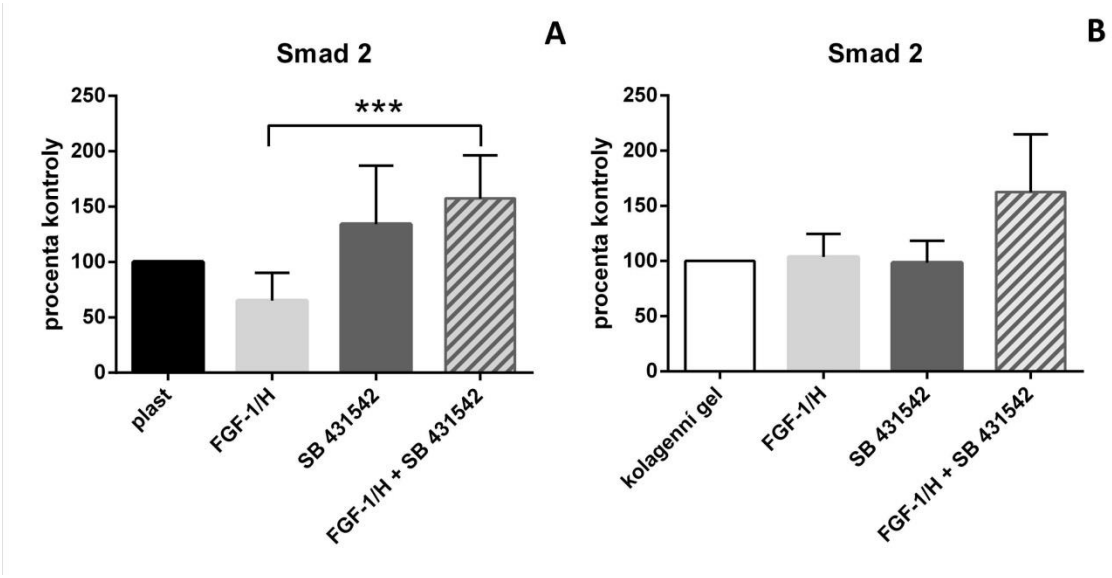



**Graf č. 14: Vliv inhibice TGFR I na expresi α-SMA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

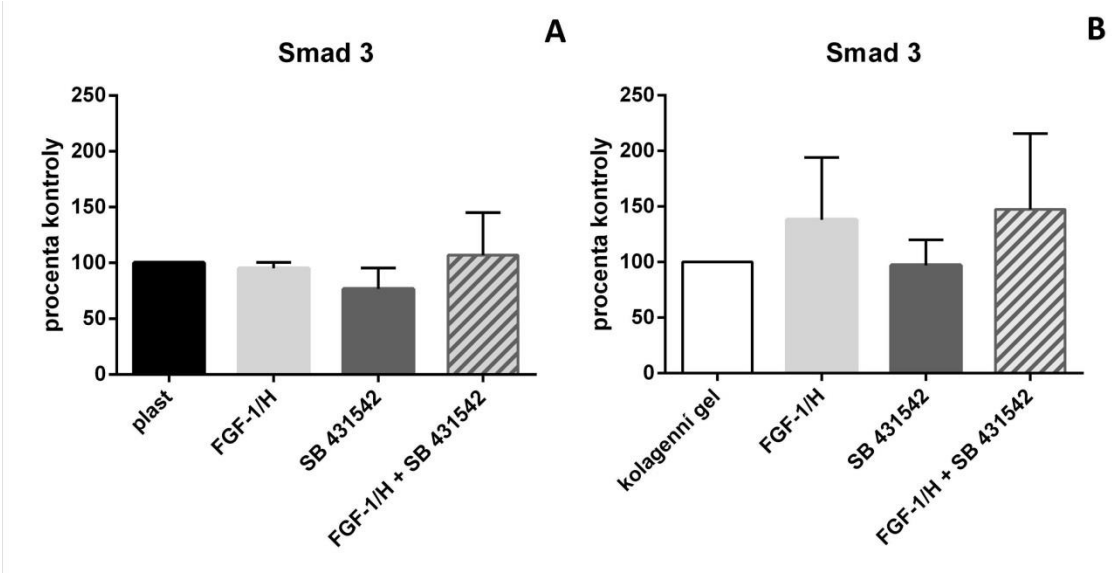



**Graf č. 15: Vliv inhibice TGFR I na expresi MMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$**

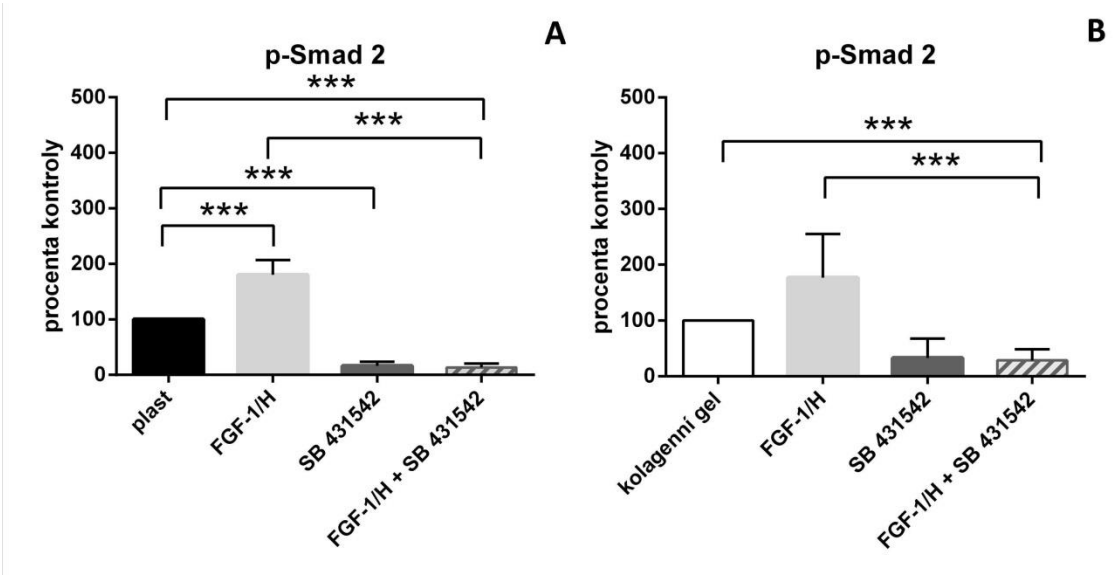
Mechanismy působení TGF-β1 i FGF-1 jsou zprostředkovány různými signálními dráhami. Jednou z možností je působení přes proteiny Smad. Proto jsme sledovali účinek FGF-1/H a inhibitoru SB 431542 na jejich fosforylaci. SB 431542 sice nemá vliv na množství Smad 2 (graf č. 16) a Smad 3 (graf č. 17), ale v 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.



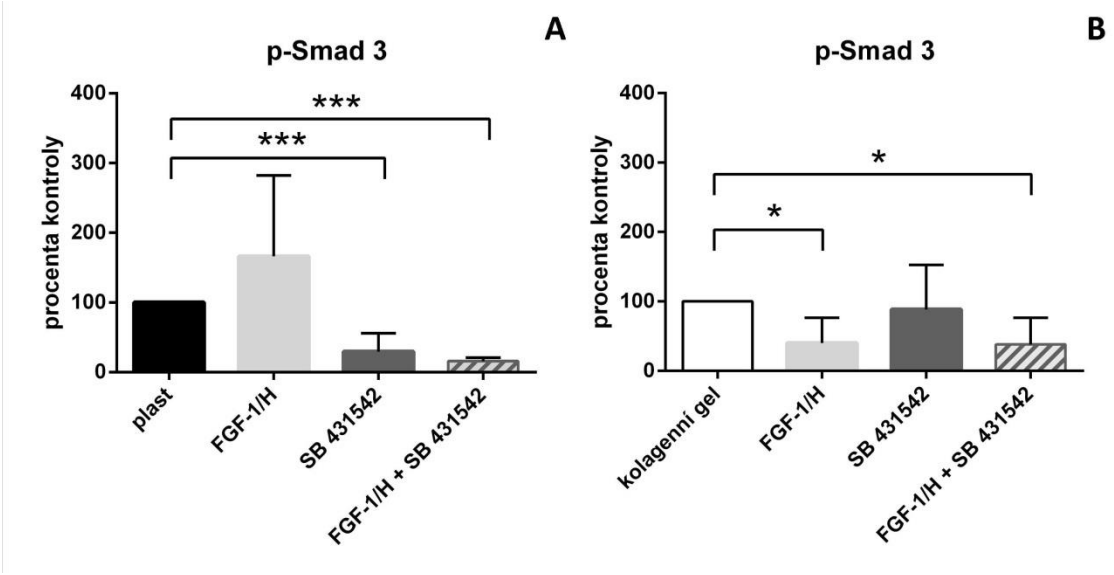

**Graf č. 16: Vliv inhibice TGFR I na expresi Smad 2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**




**Graf č. 17: 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. 18: Vliv inhibice TGFR I na expresi p-Smad 2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

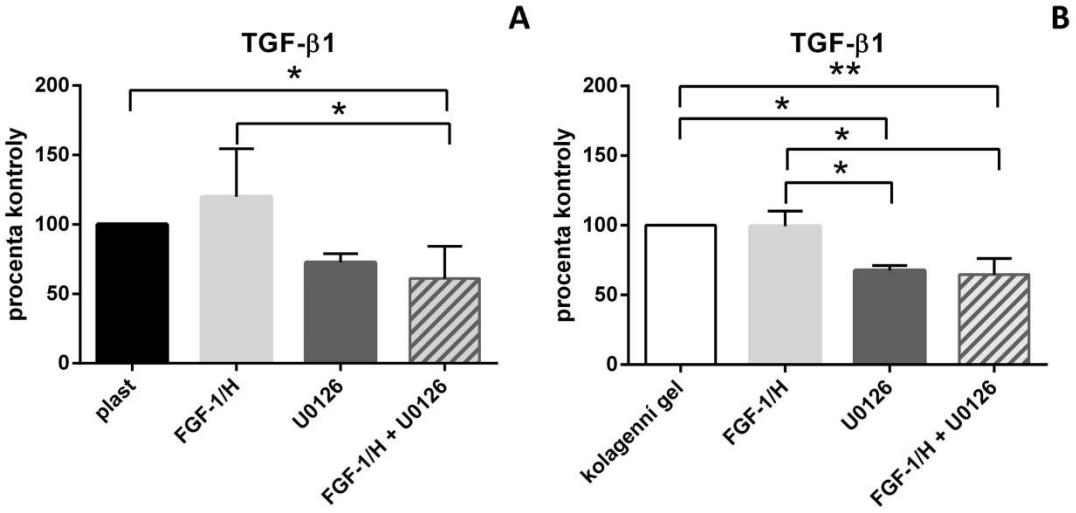



**Graf č. 19: Vliv inhibice TGFR I na expresi p-Smad 3 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**

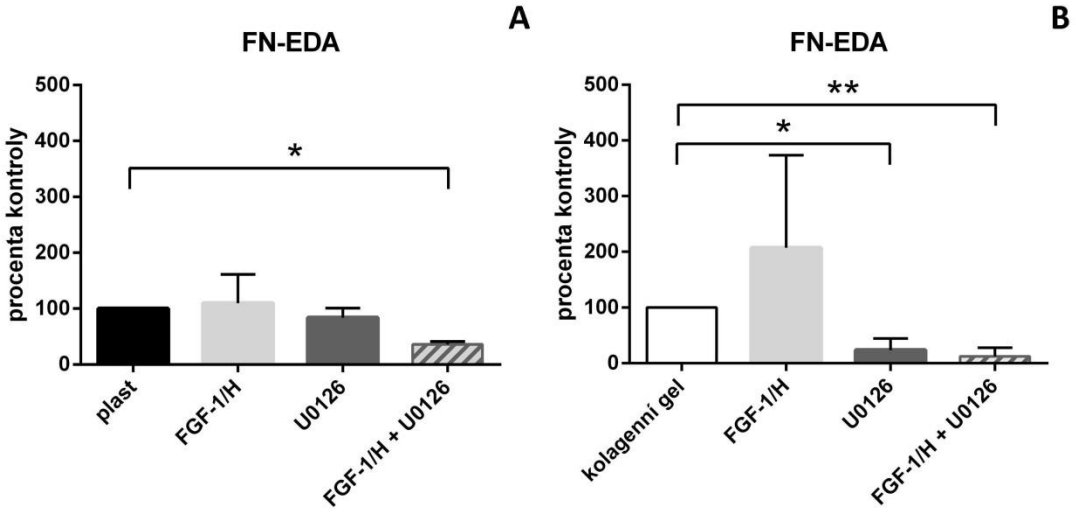
### 6.1.9. EXPRESE PROTEINŮ PO INHIBICI SIGNÁLNÍ DRÁHY MEK/ERK

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. 20 B) a v kombinaci s FGF-1/H i v buňkách na plastu (graf č. 20 A). Stejné účinky měla inhibice na expresi FN-EDA (graf

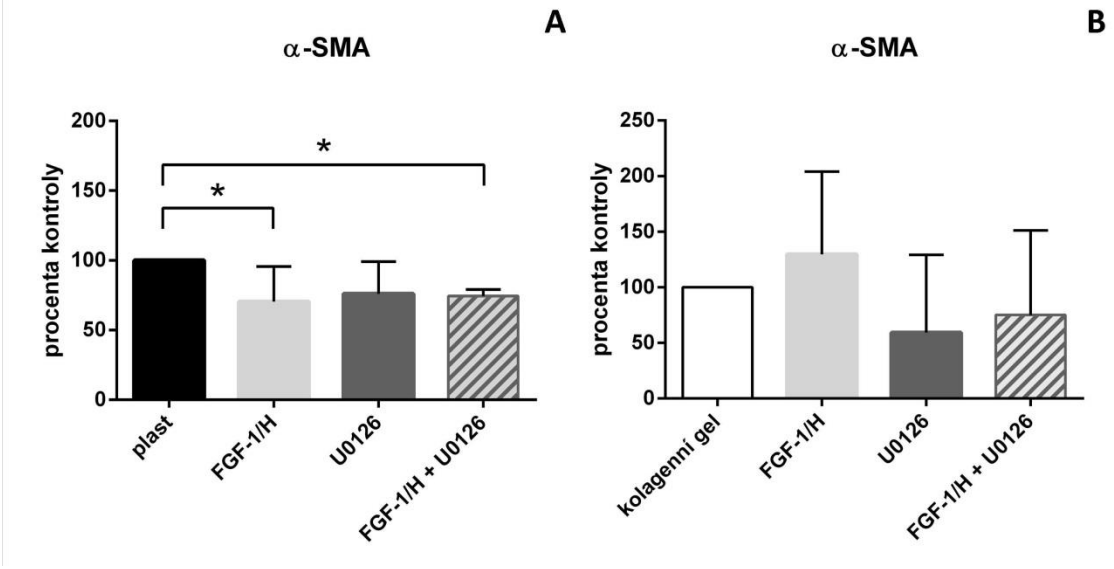
č. 21 A, B). K mírnému poklesu hladiny α-SMA došlo při kombinaci inhibitoru a FGF-1/H v buňkách na plastu, ale v buňkách v kolagenním gelu tento efekt nenastal (graf č. 22 A, B). Na expresi MMP-2 nebyla inhibitorem významně ovlivněna (graf č. 23 A, B).



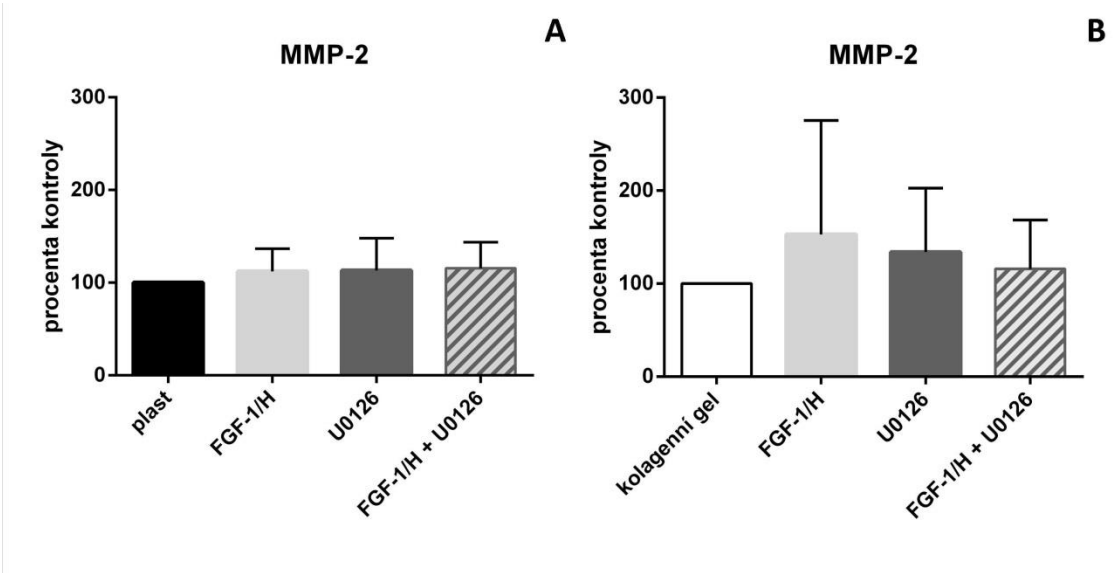

**Graf č. 20: Vliv inhibice MEK/Erk na sekreci TGF-β1 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**




**Graf č. 21: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi FN-EDA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, p ≤ 0,05**




**Graf č. 22: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi α-SMA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$**




**Graf č. 23: Vliv inhibice MEK/Erk na expresi MMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=3, $p \leq 0,05$**

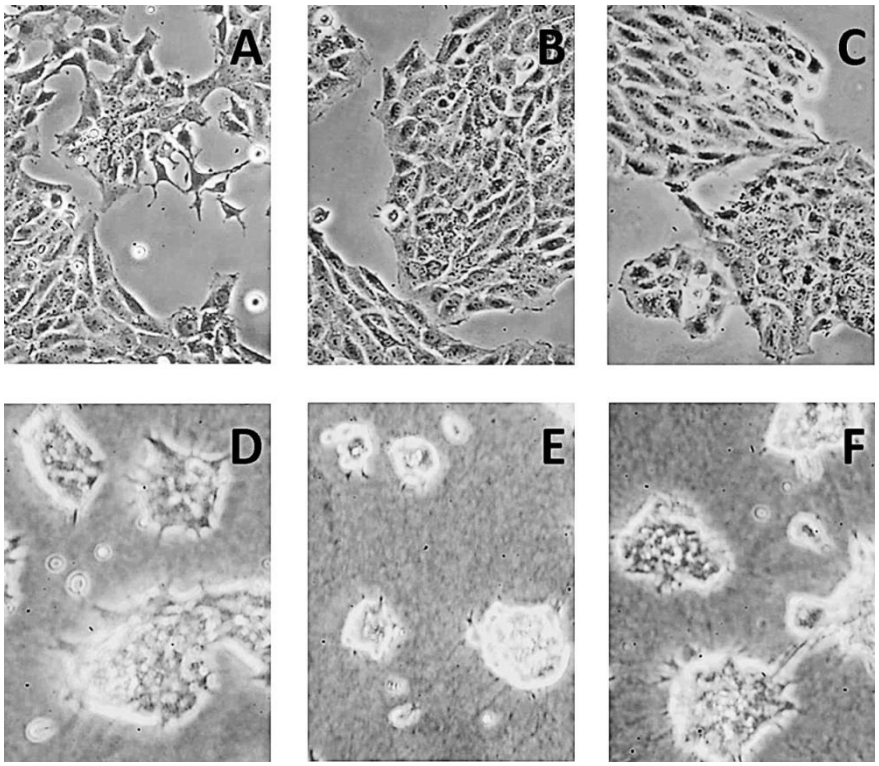
## 6.2. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA BUNĚČNOU LINII HSC-T6

V druhé části jsme pracovali s buněčnou linií HSC-T6, kterou nám laskavě poskytnul prof. Weiskirchen (Institut für Molekulare Pathobiochemie, RWTH Universitätsklinikum Aachen, Germany). HSC-T6 je imortatizovaná buněčná linie vykazující typické znaky aktivovaných HSC. Opět jsme porovnávali buňky kultivované v 2D prostředí na plastu 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.

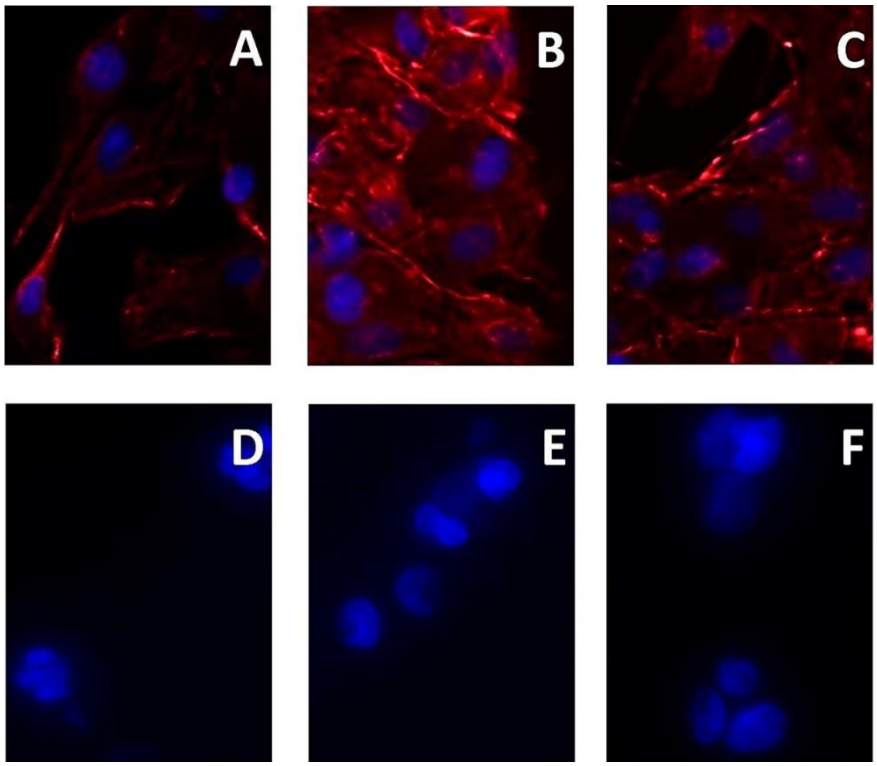
### 6.2.1. MORFOLOGIE BUNĚK

Buňky kultivované na plastu samotné či s přídavky cytokinů nevykazují žádné morfologické změny (obr. č. 11 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. 12 A). Po stimulaci buněk TGF-β1 dochází k zesílení exprese α-SMA (obr. č. 12 B) avšak FGF-1/H stimulaci vyvolanou TGF-β1 snižuje jen mírně (obr. č. 12 C).

Oproti tomu buňky kultivované v kolagenním gelu tvoří výrazné shluky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky (obr. č. 11 D). Po přidání TGF-β1 se shluky zmenšují a cytoplazmatické výběžky zkracují (obr. č. 11 E). FGF-1 potlačuje morfologické změny vyvolané TGF-β1 (obr. č. 11 F). Exprese stresových vláken pozitivních na α-SMA je vlivem kolagenního gelu zcela potlačena (obr. č. 12 D, E, F).




**Obrázek č. 11: Morfologie HSC-T6 kultivovaných na plastu (A, B, C) a v kolagenním gelu (D, E, F) s přídavkem TGF-β1 (B, C) nebo TGF-β1 v kombinaci s FGF-1/H (C, F) po 72 hodinách od vysazení, zvětšeno 100 x**



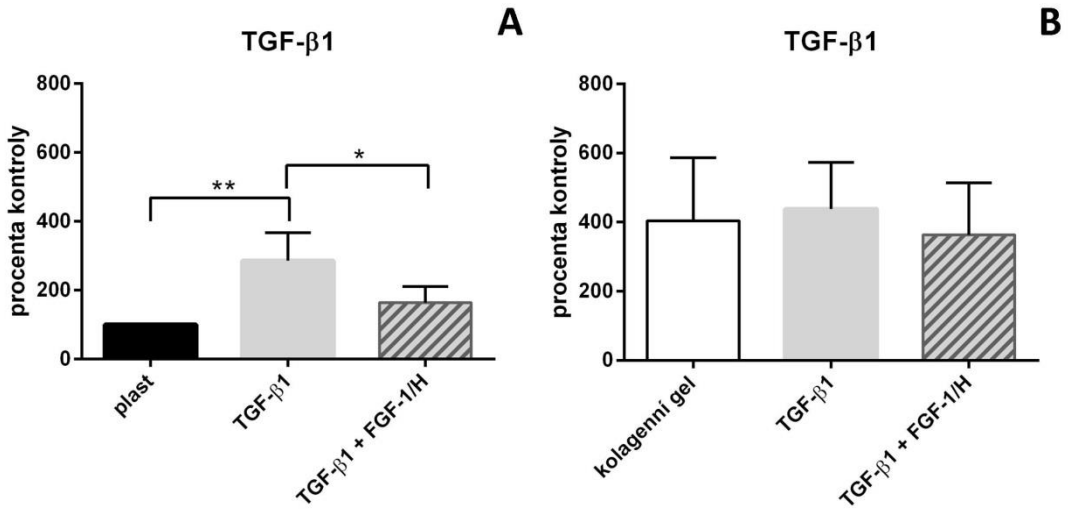

**Obrázek č. 12: Imunocytochemické barvení α-SMA v HSC-T6 kultivovaných na plastu (A, B, C) a v kolagenním gelu (D, E, F) s přídavkem TGF-β1 (B, E) nebo TGF-β1 v kombinaci s FGF-1/H (C, F) po 72 hodinách od vysazení, zvětšeno 1000 x**

### 6.2.2. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA EXPRESI mRNA MARKERŮ MFB FENOTYPU

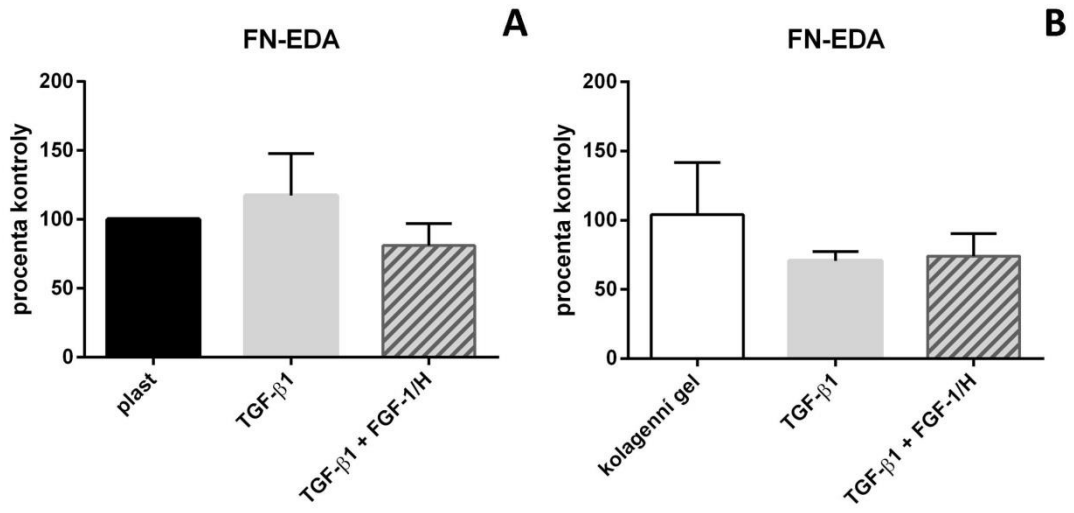
Pomocí qPCR jsme stanovili expresi mRNA TGF-β1, FN-EDA, α-SMA a kolagenů typu 1α2 a 1α4. Buňky byly kultivovány na plastu nebo v kolagenním gelu, samotné nebo s přídavkem výše uvedených růstových faktorů. Výsledky jsou uvedeny v procentech kontrolních buněk na plastu.

Stimulace HSC-T6 na plastu růstovým faktorem TGF-β1 měla za následek autoindukci mRNA TGF-β1 (graf č. 24 A) a zvýšení exprese α-SMA (graf č. 26 A). Na expresi FN-EDA (graf č. 25 A) a obou typů kolagenu (graf č. 27 A, 28 A) nemělo přidání TGF-β1 k buněčné kultuře žádný vliv. Přídavek FGF-1/H měl vliv pouze na mRNA TGF-β1 (graf č. 24 A), kdy snížil expresi na hladinu kontrolních buněk.

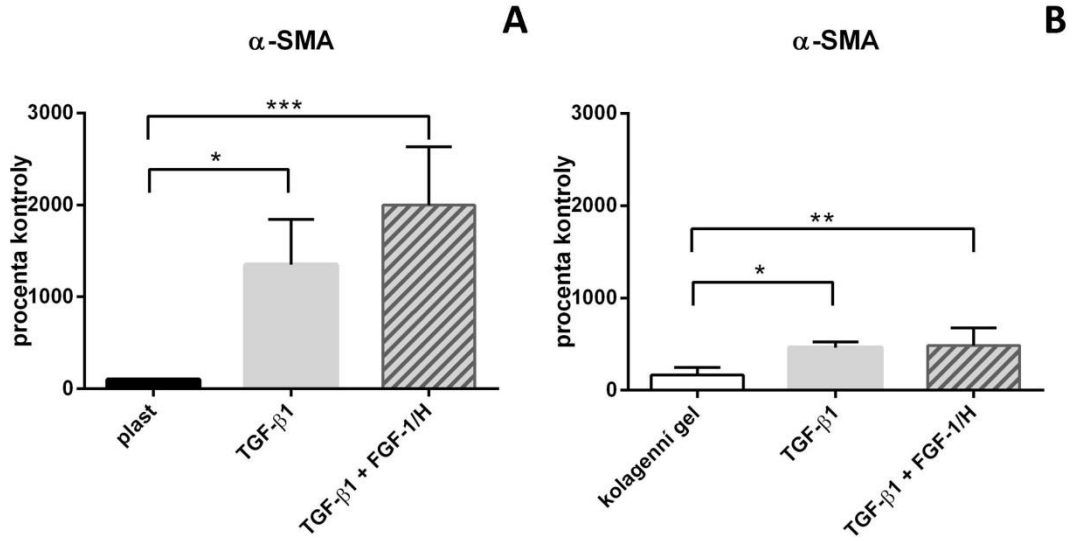
Buňky v kolagenním gelu reagovaly na TGF-β1 pouze zvýšenou expresí α-SMA (graf č. 26 B). Na rozdíl od buněk na plastu zde nedocházelo k parakrinní stimulaci exprese TFG-β1 (graf č. 24 B). Shodně s buňkami na plastu jsme nepozorovali žádnou indukci kolagenu (graf č. 27 B, 28 B) nebo FN-EDA (graf č. 25 B).



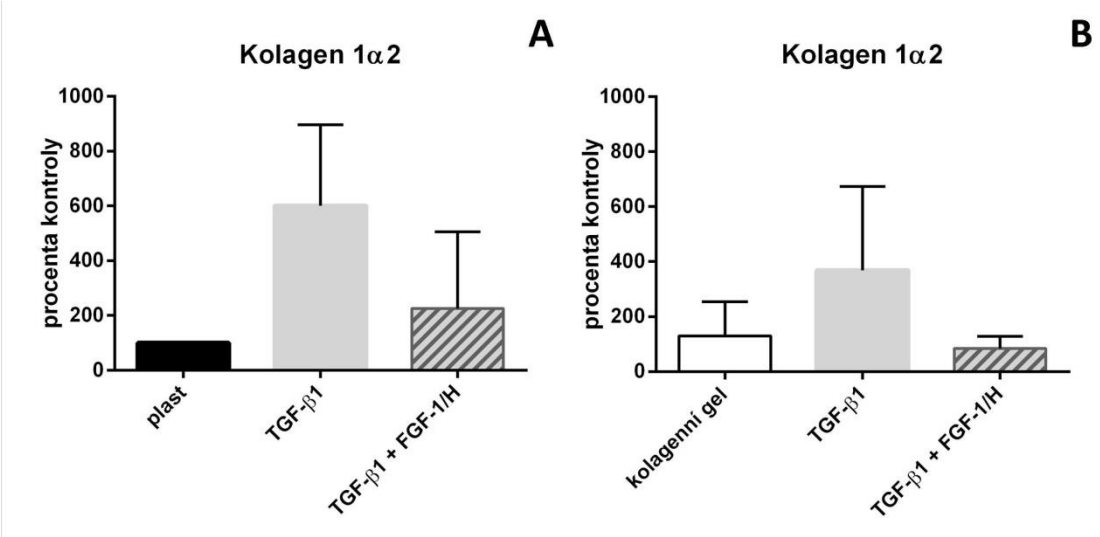

**Graf č. 24: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na autoindukci mRNA TGF-β1 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, $p \leq 0,05$**



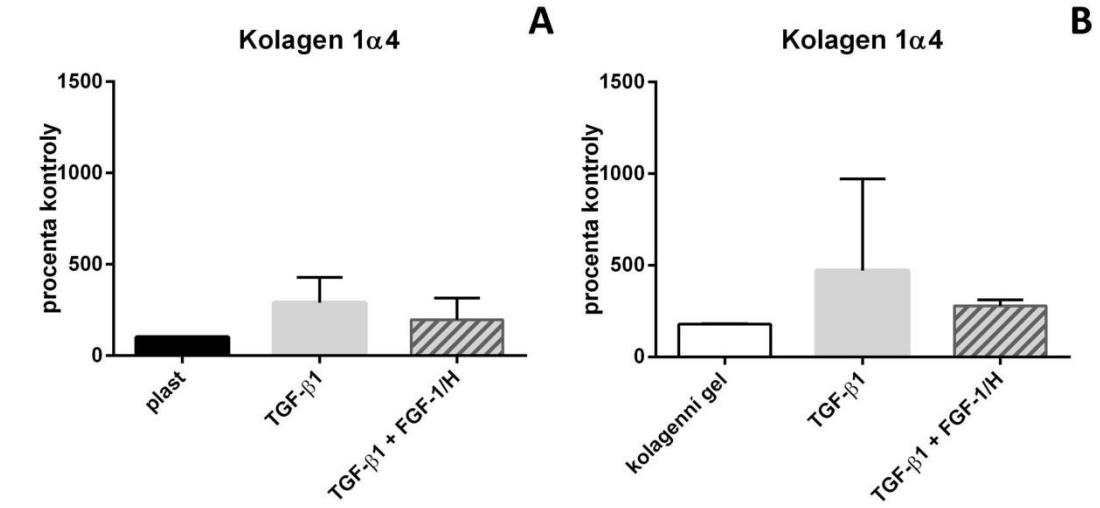

**Graf č. 25: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA FN-EDA v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**




**Graf č. 26: 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**



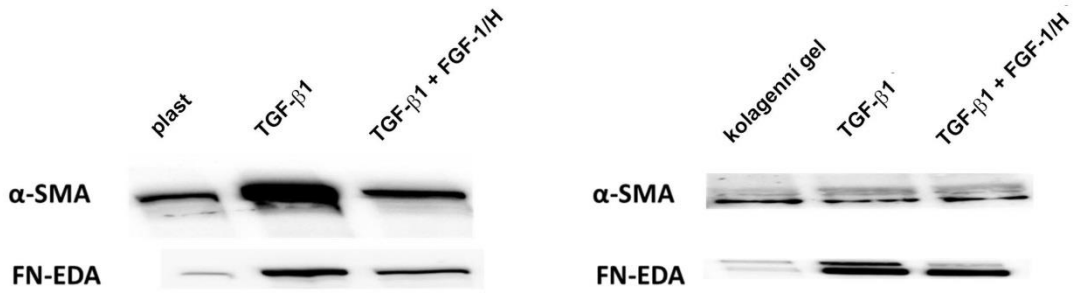

**Graf č. 27: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA kolagenu 1α2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**




**Graf č. 28: 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. 13). 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.

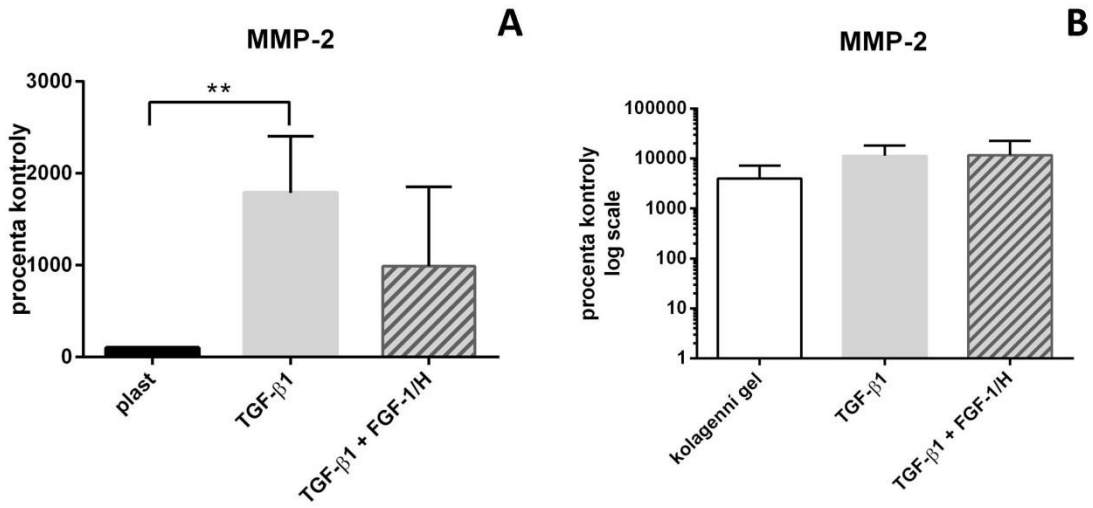



**Obrázek č. 13: Western blot α-SMA a FN-EDA v HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu, n=3**

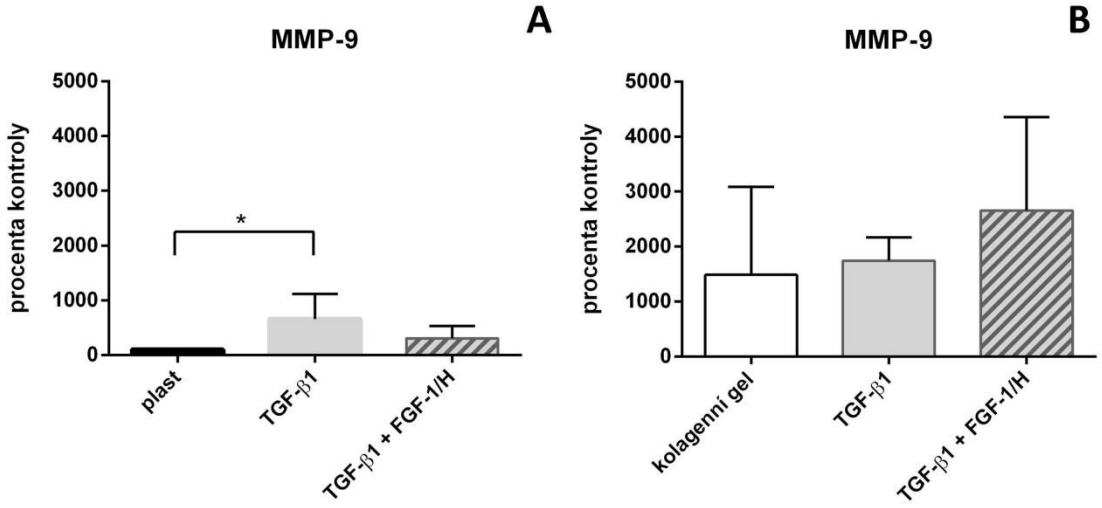
### 6.2.4. VLIV TGF-β1 A FGF-1/H NA PROTEOLYTICKOU AKTIVITU

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-β1 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-β1 i FGF-1/H zcela potlačen kultivačním prostředím (grafy č. 29 B, 30 B, 31 B).

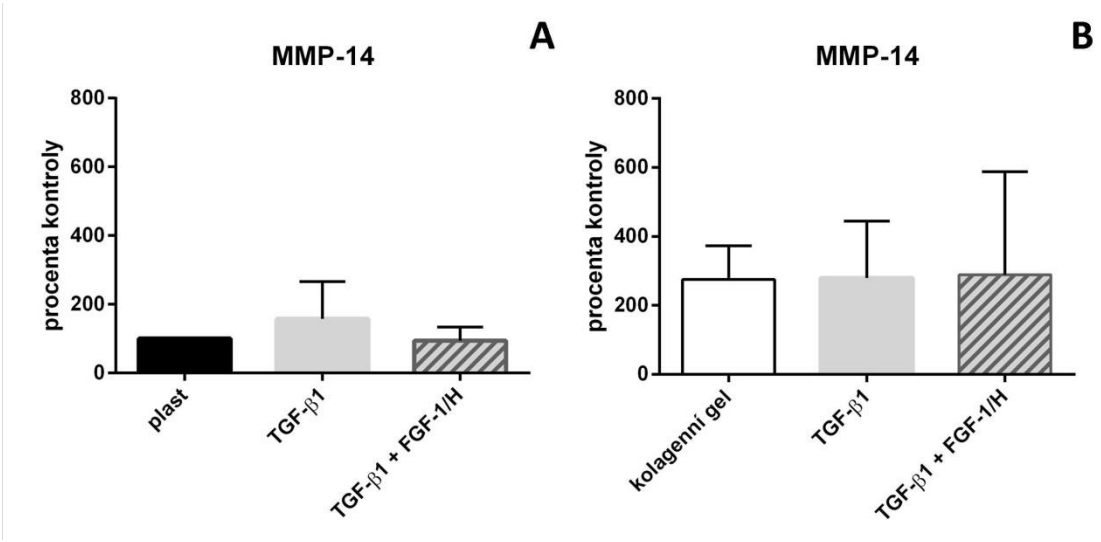
Exprese mRNA TIMP jsou též ovlivněné cytokiny pouze v buňkách na plastu (grafy č. 32, 33, 34). TIMP-1 je vlivem TGF-β1 zvýšen. FGF-1/H efekt TGF-β1 na expresi mRNA TIMP-1 částečně tlumí (graf č. 32 A). Naproti tomu TIMP-2 pod vlivem TGF-β1 klesá a FGF-1/H tento efekt ještě prohlubuje (graf č. 33 A).



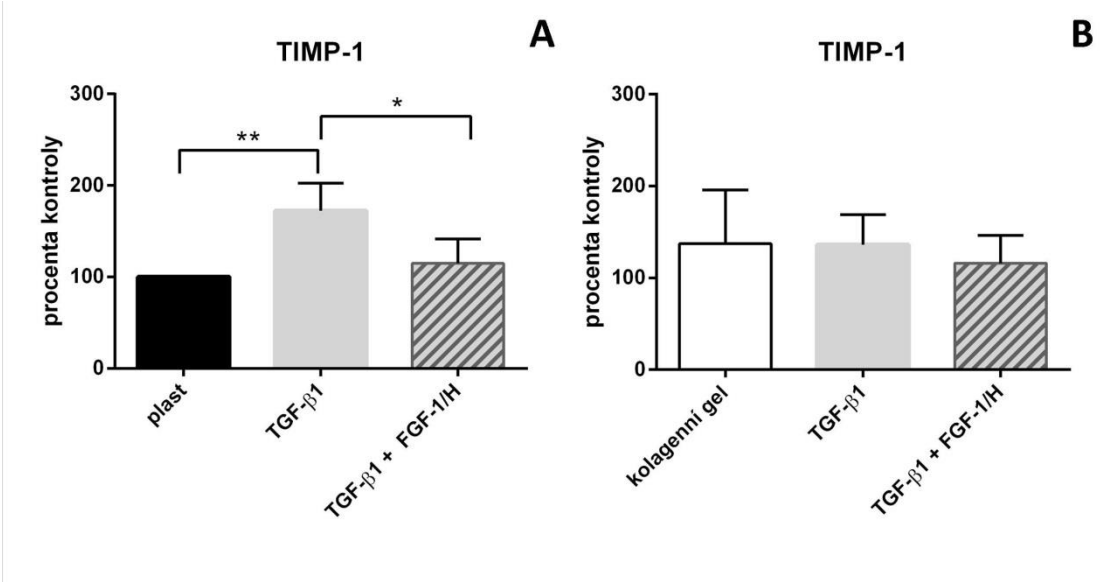

**Graf č. 29: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**



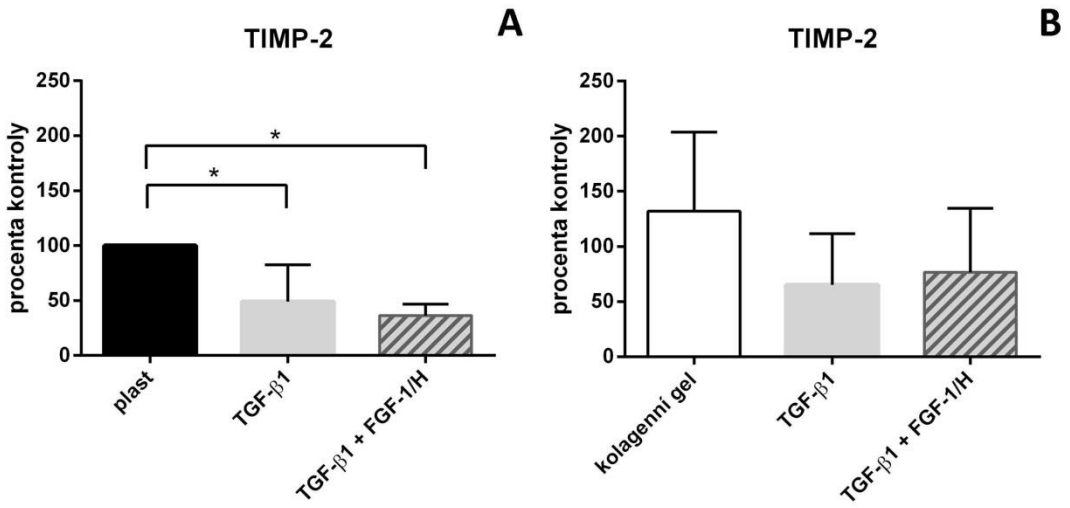

**Graf č. 30: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-9 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**



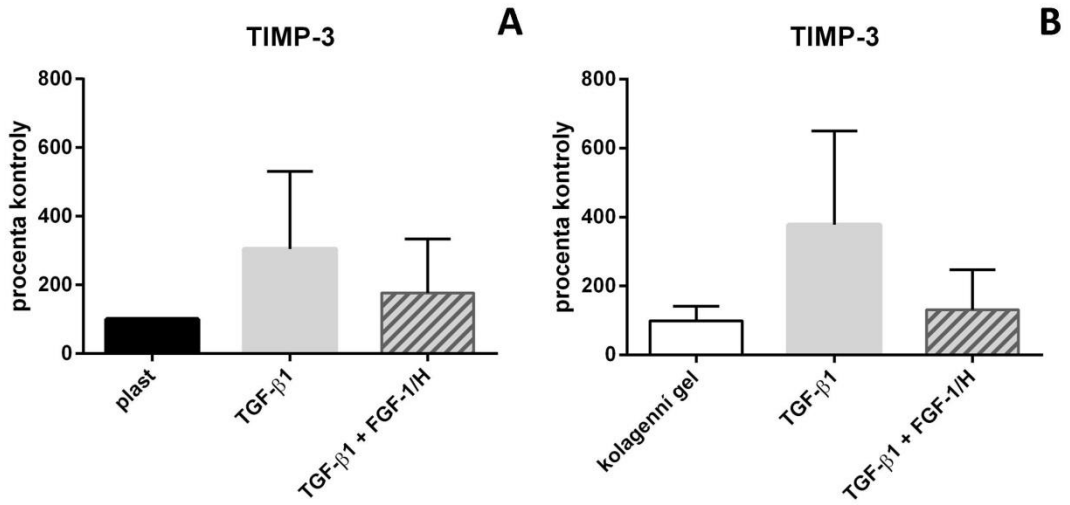

**Graf č. 31: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA MMP-14 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**




**Graf č. 32: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-1 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**

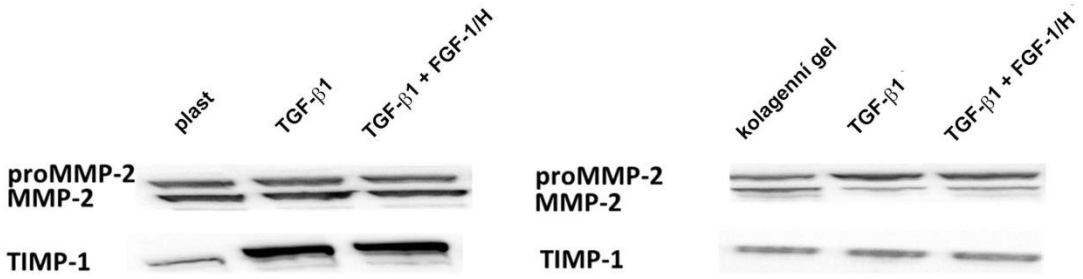



**Graf č. 33: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-2 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**



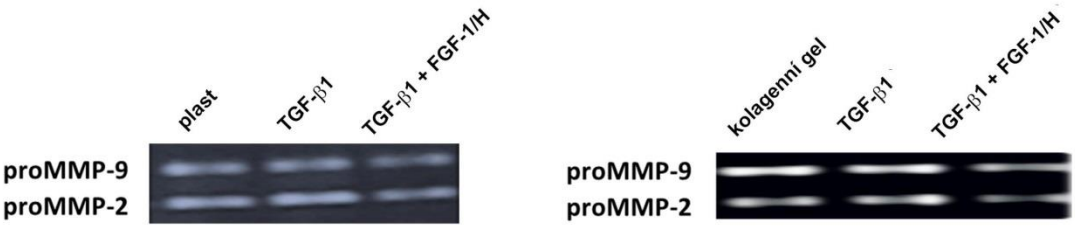

**Graf č. 34: Vliv TGF-β1 a FGF-1/H na expresi mRNA TIMP-3 v buňkách na plastu (A) a v kolagenním gelu (B), n=4, p ≤ 0,05**

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. 14: Western blot MMP-2 a TIMP-1 v HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu, n=3**

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. 15: Želatinová zymografie MMP-2 a MMP-9 secernovaných HSC-T6 kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu, n=3**

# 7. SHRNUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

V první části práce jsme sledovali účinky FGF-1 na primokulturu jaterních myofibroblastů získaných ze zdravých jater potkanů, a to jak ve standardním kultivačním prostředí na plastu, tak v 3D prostředí kolagenního gelu.

Z našich experimentů vyplývá, že FGF-1 neovlivňuje proliferaci MFB, ale má vliv na expresi proteinů klíčových v patogenezi jaterní cirhózy: hladkosvalového α aktinu (α-SMA) a fibronektinu (FN-EDA). FGF-1 snižuje expresi α-SMA a zvyšuje expresi FN-EDA v MFB na plastu. Působení FGF-1/H v kolagenním gelu je mírnějšího rázu.

TGF-β1 se váže pomocí povrchového receptoru TGFR I na membránu buněk a spouští fosforylaci proteinů SMAD a aktivuje dráhu MEK/Erk. Zjišťovali jsme zda FGF-1 zasahuje signalizace zprostředkované TGF-β1. TGFR I jsme zablokovali inhibitorem SB 431542, MEK1/2 dráhu jsme inhibovali pomocí UO126. Z našich výsledků vyplývá, že vliv obou inhibitorů je podobný. Exprese FN-EDA pod vlivem inhibitorů klesá, ale exprese α-SMA klesá až po přidání FGF-1/H k inhibitoru.

V druhé části práce jsme sledovali vliv růstových faktorů TGF-β1a FGF-1 na buněčnou linii HSC-T6 na plastu a v 3D prostředí kolagenního gelu.

Zaměřili jsme se na účinky FGF-1 na časně aktivované HSC, které podléhají regulaci TGF-β1 ve větší míře než aktivované MFB. Po stimulaci buněk na plastu růstovým faktorem TGF-β1 silně vzrostla exprese α-SMA a FN-EDA. FGF-1/H snižuje tuto expresi na původní úroveň. Dále FGF-1/H mírně zvyšuje hladiny MMP-2 vylučovaných do média. Kolagenní gel mění morfologii buněk i exprese markerů MFB, především α-SMA. Stimulace buněk TGF-β1 ke zvýšení hladiny FN-EDA, ale ne hladiny α-SMA. I přes rozdílné chování buněk na plastu a v kolagenním gelu FGF-1/H snižuje expresi FN-EDA v obou prostředích. Z našich experimentů vyplývá, že FGF-1 by mohl být antagonistou TGF-β1, i když mechanismus není zatím objasněn.

# 8. DISKUZE

Klíčové buňky jaterní fibrózy jsou HSC a MFB. V neporušených játrech HSC ukládají triacylglyceroly a retinoidy, ale po poškození jater tuto vlastnost ztrácejí. HSC 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 opakovaných pasážováním neparenchymové frakce jaterních buněk bohaté na HSC. V druhé části práce jsme se zaměřili na vliv kultivačního prostředí a cytokinů TGF-β1 a FGF-1/H na buněčnou linii HSC-T6, která představuje časně aktivované HSC.

## 8.1. VLIV FGF-1/H NA JATERNÍ MFB *IN VITRO*

TGF-β1, 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-β1 zvyšuje hromadění FN-EDA izoformy (Muro a spol., 2008, Serini a spol., 1998). Profibrogenní účinky TGF-β1 jsou ještě zesíleny jeho schopností parakrinně i autokrinně stimulovat svojí vlastní expresi (Wen et al. 2003). Hladina TGF-β1 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-β1, pod jehož vlivem klesají i množství FN-EDA a α-SMA. Dlouhodobá kultivace na plastu vedla v našich experimentech ke zvýšené syntéze TGF-β1, který je jední z hlavních cytokinů indukující 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-β1 indukuje přeměnu fibroblastů na MFB epitelo-mezenchymální tranzicí (EMT). A i když molekulární mechanismy, kterými se řídí TGF-β1 vyvolaná EMT, nejsou zcela objasněny, většina experimentů naznačuje, že je zprostředkována především Smad signální dráhou (Ramos a spol., 2010). TGF-β1 působí na buňky především Smad zprostředkovanou signalizací, i když jsou známy i na Smad nezávislé signální dráhy jako jsou MEK/ERK, p38, PI3K a JNK (Attisano a Wrana, 2002). Kim a kolektiv prokázali, že autoindukce TGF-β1 je zprostředkována právě JNK signální drahou (Kim a spol., 1990). Tvrzení Ramose a kolektivu, že TGF-β1 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 inhinitoru 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-β1 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-β1 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-β1 v médiu na plastu i v kolagenním gelu. Sekrece extracelulárního TGF-β1 však byla snížena i při použití inhibitoru MEK/ERK signální dráhy U0126 kombinaci s FGF-1/H. Z čehož vyplývá, že indukce TGF-β1 i působení FGF-1/H na ni, je závislá na více extracelulárních signálech s přesahy do jiných signálních drah.

V lidských ledvinných buňkách TGF-β1 aktivuje PI3K signání dráhu, čímž reguluje alternativní sestřih FN pre-mRNA a dochází ke zvýhodnění EDA izoformy (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 PI3K. To naznačuje, že exprese FN-EDA během našich experimentů nebyla regulována pouze TGF-β1.

TGF-β1 indukuje nejprve expresi FN-EDA a poté společně stimulují expresi α-SMA (Serini a spol., 1998). Při našich experimentech měl přídavek 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 způsobená 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-β1 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-β1 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 (Becerril a spol., 1999).

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.

## 8.2. VLIV TGF-β1 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 přídavkem TGF-β1, 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-β1 v HSC-T6 na plastu vyvolává expresi vlastní mRNA, což potvrzuje práci Kim a kolektivu o autoregulaci TGF-β1 (Kim a spol., 1990). Dále indukoval expresi α-SMA, ale na expresi mRNA prokolagenu 1α2 ani 1α4 neměl vliv. Zvýšení exprese FN-EDA vlivem TGF-β1, 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-β1 stimuluje kontrakci nativních kolagenních gelů tím, že indukuje expresi α-SMA v HCS (Kharbanka a spol., 2004). Arora ve své práci uvádí, že TGF-β1-indukovaný nárůst α-SMA v gingiválních fibroblastech je závislý na rigiditě kultivačního prostředí (Arora a spol., 1999). Interakce kolagenních vláken s integrinem α2β1 může být dle našeho názoru omezujícím faktorem v regulaci FN-EDA a α-SMA. Z našich výsledků plyne, že TGF-β1 nedokáže indukovat expresi α-SMA v kolagenním gelu. Exprese FN-EDA není závislá na rigiditě prostředí a TGF-β1 indukuje jeho expresi.

Naše výsledky ukazují, že prostřednictví FGF-1/H může docházet ke snížení MFB diferenciace, ale mechanismus není založen pouze na down-regulaci exprese genů. FGF-1/H snížil TGF-β1 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 FHF-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-β1, 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-β1 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, idukcí 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.

# 9. 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-β1 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.

Z našich výsledků dále vyplývá, že 3D kultivace v kolagenním gelu významně mění fenotyp jaterních MFB. Dochází ke snížení exprese klíčového profibrogenního cytokinu TGF-β1 i snížení expresí MFB markerů FN-EDA a α-SMA. Exprese FN-EDA je závislá na TGF-β1, zatímco exprese α-SMA je v první řadě určena kultivačním prostředím. Kolagenní gel též aktivuje pro-MMP-2. Růstový faktor FGF-1 v kombinaci s heparinem snižoval v buňkách expresi α-SMA a v buňkách na kolagenním gelu i expresi FN-EDA. FGF-1/H může mít za určitých podmínek antifibrogenní účinky na jaterní MFB.

Hvězdicové buňky HSC-T6 jsme stimulovali pomocí TGF-β1. 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-β1 signální dráhy představuje potenciální strategii pro léčbu fibrózy. Prokázali jsme, že FGF-1 by mohl antagonizovat signály iniciované TGF-β1 a ovlivňovat tak progresi jaterní fibrózy.

# 10. PŘEHLED LITERATURY

Alcolado R, Arthur MJP, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clinical science* 1997;92:103-12

Allington TM, Schiemann WP. The Cain and Abl of epithelialmesenchymal transition and transforming growth factor-β in mammary epithelial cells. *Cells, tissue, organs* 2011;193:28-113

Arner EC, Decicco CP, Cherney R, Tortorella MD. Cleavage of native cartilage aggrecan by neutrophil collagenase (MMP-8) is distinct from endogenous cleavage by aggrecanase. *The journal of biological chemistry* 1997; 272:9294-9

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

Bataller 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

Bini A, Wu D, Schnuer J, Kudryk BJ. Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH2-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry* 1999;38:13928-36

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1993;4:197-250

Bornstein P, Agah A, Kyriakides TR. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36:1115-25

Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrale 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, Denef 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 halflife. *Journal of cellular physiology* 1989;138:221-6

del Mar Barbacid M, Fernández-Resa P, Buesa JM, Márquez G, Arecil M, Quesadaand AR, Mira E. Expression and purification of human stromelysin 1 and 3 from baculovirus-infected insect cells. *Protein expression and purification* 1998;13:243-50

Deng SJ, Bickett DM, Mitchell JL, Lambert MH, Blackbun RK, Carter HL 3rd, Naugebauer J, Pahel G, Weiner MP, Moss ML. Substrate specifity of human

collagenase 3 assessed using a phage-dispalyed peptide library. *The journal of biological chemistry* 2000;275:31422-7

Diekmann O, Tschesche H. Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9. *Brazilian journal of medical and biological research* 1994;27:1865-76

Ehrmann J, Hůlek P a kolektiv: Hepatologie, *Grada*, 2014

Elbe JA. Integrins-A versatile and old family of cell adhezion molecules. In: Elbe JA, Kühn K. *Integrin-ligand interaction*. Springer Science & Business Media 2013;1-40

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 2008;88:125-72

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

García-Alvarez J, Ramirez R, Checa M, Nuttall RK, Sampieri CL, Edwards DR, Pardo A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-β1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis. *Experimental lung research* 2009;32:201-14

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, Tanzwa 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

Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, Fridman R. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochemical and biophysical research communication* 2001;281:126-30

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;127:526-537

Hou G, Vogel W, Bendeck MP. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *The Journal of clinical investigation* 2001;107: 727-35

Igmotz 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

Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *Journal of biological chemistry* 1995;270:6691-7

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

Jezequel AM, Novelli G, Venturini C, Orlandi F. Quantitative analysis of the perisinusoidal cells in human liver; the lipocytes. *Frontiers of gastrointestinal research* 1984;8:85-90

Jiroutová A, Majdiaková L, Čermáková M, Köhlerová R, Kanta J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirhosis rat liver. *Acta Medica* 2005;48:137-44

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 Ruszová 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

Kassiri Z, Oudit GY, Sanchez O, Dawood F, Mohammed FF, Nuttall RK, Khokha R. Combination of tumor necrosis factor-α ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice. *Circulation research* 2005;97: 380-90

Keskiner I, Lutfioğlu M, Aydogdu A, Saygun NI, Serdar MA. Effect of Photobiomodulation on Transforming Growth Factor-β1, Platelet-Derived Growth Factor-BB, and Interleukin-8 Release in Palatal Wounds After Free Gingival Graft Harvesting: A Randomized Clinical Study. *Photomedicine and laser surgery* 2016;34:263-71

Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, Gold LI. Regulation of the effects of TGF-β1 by activation of latent TGF-β1 and differential expression of TGF-β receptors (TβR-I and TβR-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2001;56:907-15

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

Kim S-J, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB: Autoinduction of transforming growth factor β1 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

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

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

Knäuper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *European journal of biochemistry* 1996;235:187-91

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-β1. *Journal of hepatology* 1999;30:48-60.

Kraft PJ, Haynes-Johnson DE, Patei L, Lenhart JA, Zivin RA, Palmer SS. Fluorescence polarization assay and SDS-Page confirms matrilysin degrades

fibronectin and collagen IV whereas gelatinase A degrades collagen IV but not fibronctin. *Connective tissue research* 2002;42:149-63

Lafleur MA, Handsley MM, Knäuper V, Murphy G, Edwards DR. Endotelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the aktivity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *The journal of cell science* 2002;115:3427-38

Lambert KE, Huang H, Mythreye K, Blobe GC. The type III TGF-{beta} 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 antisence 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{beta} type II receptor expression in colon cancer cells with microsatellite instability increases metastatic potential in vivo. *The journalof biological chemistry* 2011; jbc-M111

Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi Ye. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor

of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *Journal of biological chemistry* 1997;272:20479-83

Loyden CF, Patil JJ, O´Donohoe B, Shanahan D. Near-fatal spontaneous hepatic rupture associated anabolic androgenic steroid use: a case report. *British journal of sport medicine* 2007;41:462-3

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

Malstrőm 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-β1 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

Marini S, Fasciglione GF, de Sanctis G, Dálessio S, Poloti V, Coletta M. Cleavage of bovine collagen I by neutrophil collagenase MMP-8. Effect of pH on the catalytic properties as compaed to synthetic substrates. *The journal of biological chemistry* 2000;275:18657-63

Martinez-Hernandez, A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 1992;423:1-11

Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Experomental eye research* 2007;84:1125-34

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, Buttmann 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

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner Pj, Geoghegan KF, Hambor JE. Cloning, expression, and typeII collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoathritic cartilage. *The journal of clinical investigation* 1996;97:761-8

Moilanen JA, Holopainen JM, Sorsa T, Kivelä-Rajamäki M, Tervahartiala T, Vesaluoma MH, Tervo TM. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003;44:2550-6

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

Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277:11069-76

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

Öklü R, Hesketh R, Wicky S, Metcalfe J. TGF [beta]/activin signaling pathway activation in intimal hyperplasia and atherosclerosis. *Diagnostic and Interventional Radiology* 2011;17: 290-96

Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *Journal of Hepatology* 1998;29:836-47

Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2–mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *The Journal of clinical investigation* 2001;108:1369-78

Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* 2000;22:108–12

Peterová E, Mrkvicová A, Podmolíková L, Rezácová 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 TGFβ1 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, Schwőller 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, Montaño M, García-De-Alba C, Ramírez R, Checa M, Selman M. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-β1 through MAPK/ERK kinase pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010; 299:L222-L231.

Ramos C, Montaño 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

Raza SL, Nehring LC, Shapiro SD, Cornelius LA. Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *Journal of biological chemistry* 2000;175:41243-50

Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells a key issue in liver fibrosis. *Frontiers Bioscience* 2002;7:808-26.

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

Santala A, Saarinen J, Kovanen P, Kuusela P. Activation of interstitial collagenase, MMP-1, by Staphylococcus aureus cell having surfacebound plasmin:a novel role of plasminogenrceptors of bacteria. *FEBS letter* 1999;461:153-6

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

Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, Delaissé JM. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *Journal of Cell Science* 1997;110: 589-596

Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 ativation by, serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse nd regression in 3D collagen matrices. *Journal of cell science* 2005;118:2325-40

Senoo H, Sato M, Imai K. Hepatic stellate cells-from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. *Kaibogaku Zasshi* 1997;72:79-74

Seo DW, Li H, Gudez L, Winglield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 2003;114:171-80

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-β1. *The Journal of Cell Biology* 1998;142:873-81

Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP, Welgus HG. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matirx. Evidence for enzyme-and substrate-specific responses involving prostaglandindependent mechanisms. *Journal of biological chemistry* 1993;268:8170-5

Shimbori C, Bellaye PS, Xia J, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF-β1-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

Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization, *Mollecular cell* 2000;6:743–50

Song S, Shackel NA, Wang XM, Ajami K, McCaughan GW, Gorrell MD. Discoidin domain receptor 1: isoform expression and potential functions in cirrhotic human liver. *The American journal of pathology*, 2011;178:1134-1144

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001;17:463-516

Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendás AM, Smith B, López-Otin C, Murphy G, Knäuper V. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role a potent basement membrane degrading enzyme. *Journal of biological chemistry* 2000;275:14809-16

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

Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Current molecular medicine* 2010;10:565-78

Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Aktuální informace č. 43/2013*. 24.9.2013 [cit. 12.11.2016]. Dostupné z: www.uzis.cz/system/files/ai_2013_43.pdf

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-β1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Experimental cell research* 2000;257:180-189

Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cellular signalling* 2006;18:1108-16

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 requred for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991;64:841-8

Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003;52:1347-54

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

# 11. PŘÍLOHY

## 11.1. Peterová E, Mrkvicová A, Podmolíková L, Rezácová 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.

**11.2. 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.**

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