SOUHRN

Jaterní hvězdicové buňky (HSC) a jaterní myofibroblasty (MF) jsou považovány za buňky odpovědné za syntézu extracelulární matrix (ECM). HSC a MF se liší lokalizací v jaterním lalůčku i expresí genů. HSC se nacházejí v Disseho prostoru, při poškození jater se aktivují, proliferují a přeměnují se na myofibroblastické buňky. MF jsou heterogenní skupina buněk, byly popsány portální pMF, septální sMF a interface iMF. V portobiliárním prostoru jaterního lalůčku se nacházejí pMF, které se aktivují při ischemii a městnání žluči; sMF se nacházejí uvnitř vazivových sept.

Cílem naší práce bylo porovnat změny exprese genů, které provázejí aktivaci HSC in vitro se změnami odehrávajícími se v HSC při vzniku jaterní cirhózy v modelu toxického poškození jater. Expresi vybraných genů jsme sledovali pomocí oligo cDNA arrayí zahrnujících geny kódující proteiny, proteoglykany, cytokiny, růstové faktory a geny související s metabolismem pojiva – metaloproteinasy (MMP). Zajímali jsme se také o chování MF v trojrozměrném kultivačním prostředí – fibrinovém a kolagenním gelu, které lépe simuluje podmínky ve fibrotických játrech. Poškozená jaterní tkáň je nahrazována nejdříve plasmatickým fibrinem a posléze je nahrazena jizvou s převahou kolagenu. Chování a exprese genů MF v trojrozměrném kultivačním prostředí, nebyla dosud studována.

HSC jsme vyizolovali z normálních a cirhotických jater potkanů po perfuzi pronasou a kolagenasou. HSC jsme kultivovali na plastu po dobu 2 a 7 dní, získali jsme tak HSC s odlišnými fenotypy – klidové, aktivované in vitro a in vivo. Ze zdravých i cirhotických jater jsme vykultivovali subpopulaci MF pasážováním primární kultury neparenchymových jaterních buněk. V HSC a MF jsme prokazovali imunocytochemickým barvením α -aktin hladkého svalu (α-SMA), desmin, vimentin a kyselý gliový fibrilární protein (GFAP). Expresi genů jsme měřili pomocí oligo cDNA arrayí a kvantitativní RT-PCR. Vybrané proteiny jsme prokazovali pomocí imunocytochemie. Měřili jsme také úbytek hmoty gelů během kultivace MF.

HSC aktivované kultivací na plastu ve srovnání s klidovými HSC exprimovaly ve větší míře geny pro složky extracelulární matrix (kolageny typu I, III a V), perlekan, fibronektin a osteopontin. Naopak nižší exprese byla patrná především u metaloproteas. Exprese genů v HSC čerstvě izolovaných z cirhotických jater se blížila expresi genů v HSC z normálních jater aktivovaných kultivací na plastu. Nepozorovali jsme významné rozdíly mezi MF z normálních a cirhotických jater. Během kultivace HSC se mění spektrum cytoskeletálních bílkovin. HSC se od MF liší především expresí desminu. GFAP obsahují pouze klidové HSC izolované z normálních jater, zároveň tyto buňky neexprimují α-SMA, který je detekovatelný až u aktivovaných HSC.

Přítomnost gelů měl vliv jak na morfologii, tak na expresi genů MF. Ovlivněna byla exprese cytokinů IL-6, TGF-β1, -β2, -β3, CTGF a metaloproteinas, matricelulárních proteinů trombospondinu-2 a osteopontinu. Zvýšila se exprese MMP-3, 9, 13 a 14, exprese inhibitoru aktivátoru plasminogenu se snížila. Změny v expresi byly výraznější u kolagenního gelu. MF měly schopnost solubilizovat až polovinu hmoty gelů.

Srovnání MF a aktivovaných HSC naznačilo, že jde o dva typy buněk s různou funkcí. Nebyl nalezen rozdíl mezi MF z cirhotických a z normálních jater. Zjistili jsme, že jak fibrinový gel tak zejména gel tvořený kolagenem typu I podstatně ovlivňuje jak expresi genů v těchto buňkách, tak i jejich morfologii. Trojrozměrná matrix ovlivnila expresi matricelulárních proteinů jež zasahují do regulace procesu remodelování tkání, a způsobila významné posuny v expresi cytokinů spojených s fibrogenesí. V MF se zvýšila exprese metaloproteas, což se projevilo zvýšenou schopností MF solubilizovat gely, v nichž byly kultivovány.