

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Lékařská chemie a biochemie

**VLIV EXTRACELULÁRNÍ MATRIX NA EXPRESI GENŮ
JATERNÍCH MYOFIBROBLASTŮ**

**INFLUENCE OF EXTRACELLULAR MATRIX ENVIRONMENT ON
GENE EXPRESSION IN LIVER MYOFIBROBLASTS**

Mgr. ALENA JIROUTOVÁ

Školitel: doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ 2011

Obhajoba dne

Prohlášení:

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

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

Hradec Králové, 2011

Úvodem bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům a kolegům na Ústavu lékařské biochemie LFHK, kteří přispěli ke vzniku této práce ať už pomocí, radou nebo inspirací.

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

Panu doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi, CSc, bych ráda poděkovala za vstřícnost při plnění teoretických částí mého postgraduálního studia.

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

Paní doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc. děkuji za jazykové korektury textu disertační práce.

Ráda bych poděkovala také svým kolegům, studentům postgraduálního studia za teoretickou i praktickou pomoc při řešení disertační práce a vytvoření přátelského prostředí. Ing. Rastislavu Slavkovskému děkuji za zasvěcení do technik molekulární biologie a Mgr. Lence Majdiakové za úzkou spolupráci a podporu při společném procházení úskalími experimentální práce.

Ráda bych poděkovala laborantkám Ústavu lékařské biochemie, zvláště pak Mileně Hajzlerové, která byla oporou nejen pracovně ale i lidsky.

Laborantkám Vivária LFHK, Lence Kriesfalusyové a Dagmar Ježkové, patří můj dík za pomoc při práci laboratorními potkany. Haně Hollerové z Ústavu histologie a embryologie LFHK a Světlaně Kopecké z Neurochirurgické kliniky FNHK děkuji za pomoc se zpracováním histologických preparátů.

Ráda bych poděkovala RNDr. Evě Čermákové z Ústavu výpočetní techniky za provedení statistických analýz. Doc. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Phd. z Ústavu Farmakologie LFHK děkuji za možnost využívání instrumentálního zázemí.

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

OBSAH

1.	ÚVOD	9
2.	CÍLE PRÁCE.....	10
3.	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	11
3.1.	JÁTRA.....	11
3.2.	JATERNÍ CIRHÓZA	12
3.2.1.	Patogeneze jaterní fibrózy a cirhózy.....	12
3.2.2.	Morfologická klasifikace jaterních cirhóz.....	13
3.2.3.	Experimentální modely jaterní fibrózy a cirhózy	15
3.3.	JATERNÍ MYOFIBROBLASTY	15
3.3.1.	Historie, nomenklatura HSC a MF	16
3.3.2.	Funkce HSC v normálních játrech.....	17
3.3.3.	Aktivace HSC.....	18
3.3.4.	Morfologie a imunocytochemická charakterizace HSC a myofibroblastů.....	20
3.3.5.	Vliv kultivačního prostředí na HSC a jaterní myofibroblasty	21
3.4.	SLOŽENÍ JATERNÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A JEJÍ DEGRADACE	23
3.4.1.	Kolageny a elastin	23
3.4.2.	Proteoglykany a glykoproteiny.....	24
3.4.3.	Receptory proteinů ECM – integriny	25
3.4.4.	Degradace ECM – matrix metaloproteinasy a jejich inhibitory	27
4.	METODICKÁ ČÁST	31
4.1.	LABORATORNÍ POTKANI	31
4.2.	PERFUZE JATER A IZOLACE BUNĚČNÉ FRAKCE OBSAHUJÍCÍ HSC	31
4.3.	KULTIVACE HVĚZDICOVÝCH BUNĚK A MYOFIBROBLASTŮ	31
4.4.	PŘÍPRAVA POLYMERŮ PRO KULTIVACI BUNĚK	32
4.5.	HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNĚ.....	32
4.6.	IMUNOCYTOCHEMIE HSC A MF	33
4.7.	IZOLACE RNA	33
4.8.	INKORPORACE THYMIDINU ZNAČENÉHO TRICIEM DO DNA DĚLÍCÍCH SE BUNĚK.....	33
4.9.	MICROARRAY ANALÝZA	34
4.10.	REVERZNÍ TRANSKRIPCE A REAL-TIME RT- PCR.....	34
4.11.	MĚŘENÍ ÚBYTKU HMOTY GELŮ.....	36
4.12.	STATISTICKÁ ANALÝZA	36
4.13.	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	36
5.	VÝSLEDKY	37
5.1.	HISTOLOGIE A IMUNOHISTOCHEMIE NORMÁLNÍCH A CIRHOTICKÝCH JATER	37

5.2.	CHARAKTERIZACE HSC A MF POMOCÍ VYBRANÝCH CYTOSKELETÁLNÍCH MARKERŮ IN VITRO.....	40
5.3.	EXPRESI GENŮ HSC A MF IZOLOVANÝCH Z INTAKTNÍCH CIRHOTICKÝCH JATER POTKANŮ	42
5.3.1.	Oligo cDNA array.....	42
5.3.2.	Validace výsledků arrayí pomocí rtRT-PCR.....	48
5.3.3.	Imunocytochemická detekce MMP u HSC izolovaných z normálních jater...49	
5.3.4.	Inkorporace thymidinu – dělení buněk během pasáží	50
5.4.	OVLIVNĚNÍ MF KULTIVACÍ VE FIBRINOVÉM A KOLAGENNÍM GELU.....	51
5.4.1.	Morfologie MF v gelech.....	51
5.4.2.	Inkorporace thymidinu do buněk ve fibrinovém a kolagenním gelu.....	52
5.4.3.	Výsledky oligo cDNA arrayí MF ve fibrinovém a kolagenním gelu	52
5.4.4.	Validace výsledků arrayí pomocí rt RT-PCR.....	54
5.4.5.	Imunocytochemický průkaz metaloproteinas MF v gelech.....	57
5.4.6.	Měření úbytku hmoty gelů.....	58
6.	DISKUSE.....	59
6.1.	IMUNOHISTOCHEMICKÁ A IMUNOCYTOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE HSC A MF	59
6.2.	ZMĚNY V EXPRESI GENŮ SPOJENÉ S AKTIVACÍ HSC	60
6.3.	VLIV KOLAGENNÍHO A FIBRINOVÉHO GELU NA EXPRESI GENŮ MF	64
7.	SHRNUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	67
8.	ZÁVĚR	68
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69
10.	LITERATURA.....	71
11.	PŘÍLOHY	83

1. ÚVOD

Jaterní cirhóza je onemocnění, vznikající jako odpověď na chronický zánět jaterního parenchymu různé etiologie. Charakterizuje ji destrukce parenchymu a následné nadměrné ukládání mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix) a poruchy mikrocirkulace. Nejčastější příčinou je hepatitida B a C, alkoholová i nealkoholová steatohepatitida a steatóza. Celosvětově je alkohol příčinou až 50 % všech jaterních cirhóz, v České republice je to 30 %. Ročně u nás umírá na cirhózu 20 ze 100 000 obyvatel (Příbramská, 2007). Kvůli zvyšujícímu se výskytu obezity zřejmě dojde k nárůstu jaterní fibrózy spojené s nealkoholovou steatohepatitidou (NASH). Celosvětově se udává tříprocentní prevalence NASH v populaci, v České republice však není známa (Příbramská, 2008).

Na počátku fibrogenese je nekróza nebo apoptóza hepatocytů následovaná zánětlivou reakcí. Ta aktivuje jaterní hvězdicové buňky v subendoteliálním prostoru, které ztrácejí schopnost skladovat vitamin A a mění se v myofibroblasty produkující součásti pojiva (kolageny, elastin, strukturální glykoproteiny, proteoglykany a kyselinu hyaluronovou). Změna fenotypu hvězdicových buněk a aktivace ostatních typů myofibroblastů je klíčová při rozvoji jaterní fibrózy, umožňuje kvantitativní i kvalitativní přestavbu normální extracelulární matrix. Tyto změny ovlivňují chování všech typů jaterních buněk. Myofibroblasty neprodukují jen součásti mezibuněčné hmoty, ale i cytokiny a enzymy jako např. metaloproteiny schopné degradovat extracelulární matrix.

Celý proces aktivace hvězdicových buněk a jeho regulace se v posledních desetiletích intenzivně zkoumá. Fibróza je z dnešního pohledu dynamický proces, její regrese je spojená se snížením počtu myofibroblastů, aktivací metaloproteiny a snížením obsahu kolagenu. Není zcela jasné, do jaké míry jde o likvidaci myofibroblastů apoptózou a do jaké míry jde o návrat myofibroblastů ke klidovému fenotypu. Předpokládá se, že klíčovou úlohu hrají interakce hvězdicových buněk a myofibroblastů s extracelulární matrix. Poznatky o cirkulujících markerech aktivace hvězdicových buněk by mohly poskytnout cenné informace využitelné pro diagnostiku, terapeutické monitorování fibrogenese a v budoucnosti i k biologické terapii.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem naší práce bylo:

1. Izolovat hvězdíkové buňky a myofibroblasty z normálních a z cirhotických jater potkanů. Charakterizovat je podle exprese cytoskeletálních markerů.
2. Popsat změny v expresi genů provázející aktivaci hvězdíkových buněk a jejich přeměnu na myofibroblasty. Porovnat expresi genů hvězdíkových buněk izolovaných ze zdravých a z cirhotických jater potkanů.
3. Zjistit jak myofibroblasty reagují na přítomnost trojrozměrné kolagenní a fibrinové matrix při kultivaci in vitro a popsat zda a jakým způsobem to ovlivní jejich fenotyp.

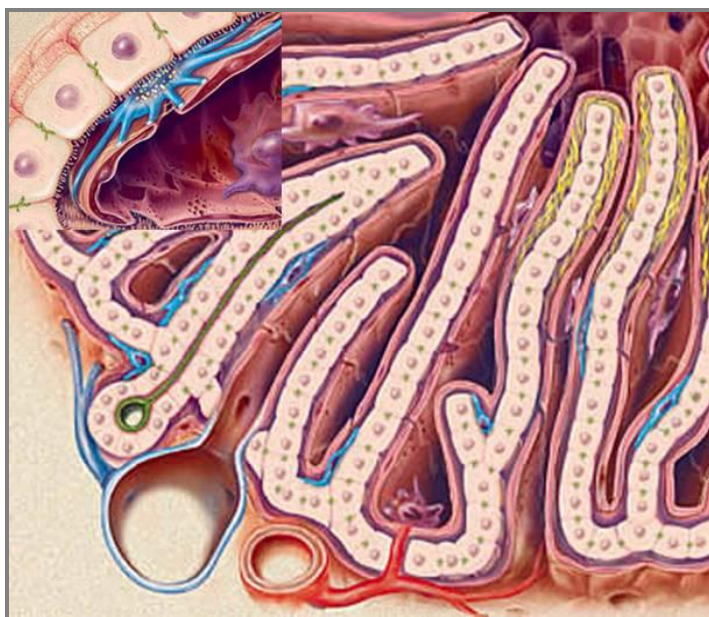
3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

3.1. JÁTRA

Játra zaujímají centrální postavení v intermediárním metabolismu. Probíhá zde metabolismus sacharidů, lipidů, cholesterolu a bílkovin. Játra metabolisují dusíkaté látky, zabezpečují tvorbu močoviny a účastní se na detoxikaci xenobiotik.

Jaterní parenchym tvoří hepatocyty (60-70 % buněčné populace jater) uspořádané do trámců kolem centrální žíly protékající středem lalůčku. Lalůček je základní morfologickou jednotkou jater (viz Obr. č. 1). Má cylindrický tvar, délku několik milimetrů a průměr až 2 mm. Podél trámců hepatocytů probíhají jaterní sinusoidy, prostor mezi stěnou sinusoid a hepatocyty se nazývá tzv. perisinusoidální prostor (Disseho prostor). Uprostřed trámců se nacházejí žlučové kapiláry ústící do terminálních žlučovodů uložených v septech mezi sousedními lalůčky. Epitelové buňky intrahepatálních žlučových vývodů se nazývají cholangiocyty (tvoří 2-3 % buněčné populace jater).

V místě styku tří nebo čtyř sousedících lalůček se nachází portobiliární prostor vyplněný řídkým kolagenním vazivem, kudy probíhají terminální portální venuly, terminální jaterní arterioly a terminální lymfatické cévy (Ehrmann, Hůlek, 2010).



Obrázek č. 1: Schéma jaterního lalůčku, trámce hepatocytů s jaterními sinusoidami a portobiliárním prostorem. Ve výřezu detail Disseho prostoru a HSC (převzato z Friedman and Arthur, Science & Medicine, 2002).

Kromě hepatocytů a cholangiocytů se však v játrech najde skupina tzv. neparenchymových buněk. Z nich 40-60 % tvoří endotelové buňky sinusoid. Dalšími představiteli jsou Kupfferovy buňky - tkáňové makrofágy, zakotvené ve stěně sinusoid (25-40 %), jaterní hvězdicové buňky z Disseho prostoru (5-10 %) a jaterní NK buňky (natural killer cells), zvané ptt cells (Alpini, 1994).

3.2. JATERNÍ CIRHÓZA

3.2.1. Patogeneze jaterní fibrózy a cirhózy

Jaterní cirhóza je onemocnění, vznikající jako odpověď na chronický zánět jaterního parenchymu vyvolaný virovou hepatitidou B a C, onemocněním žlučových cest, metabolickými chorobami (nealkoholická steatohepatitida, Wilsonova choroba, hemochromatóza), autoimunitním procesem či toxickým poškozením jater nejběžněji alkoholem (Ehrmann, Hůlek, 2010). Při chronickém poškození jater z výše zmiňovaných důvodů dochází k rozpadu původní struktury jaterních lalůček vlivem nekrózy a apoptózy hepatocytů a jejich náhradou vazivem. Změny morfologické i funkční se týkají nejen hepatocytů, ale i ostatních jaterních buněk. Pro cirhózu je charakteristická tvorba regeneračních uzlů ohraničených vazivem. Hromadění vaziva je následkem posunu rovnováhy mezi akumulací proteinů ECM a jejich degradací ve prospěch fibrogenese. Dochází k akumulaci zejména kolagenu typu I a III, proteoglykanů a glykoproteinů. Změny ECM jsou nejen kvantitativní, ale i kvalitativní. Normální ECM připomínající svým složením bazální membránu se mění na ECM s převažujícím fibrilárním kolagenem typu I.

Cesta od prvotního zánětu k chronickému zánětu a fibróze je velmi složitá. Pokusím se zde popsat alespoň základní aspekty tohoto procesu. Podíváme-li se na buněčnou úroveň příčin vzniku fibrózy, tak hepatocyty mohou být akutně poškozeny hypoxií, oxidačním stresem ze zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS), žlučovými kyselinami při cholestáze, nebo faktorem nádorové nekrózy (TNF) u virových onemocnění. Hepatocyty pak jdou buď do apoptózy nebo nekrotizují. Nekróza je provázena zánětem, aktivuje se proces hemokoagulace a antifibrinolytický systém. Degranulace destiček přispívá k vasodilataci a zvýšení permeability kapilár (Wynn, 2008). Na aktivovaný cévní endotel (Volpes, 1991) adherují leukocyty, které prostupují do mezibuněčného prostředí. Apoptóza hepatocytů a následná fagocytóza apoptických fragmentů Kupfferovými buňkami vede k produkci chemokinů a cytokinů. Jaterní hvězdicové buňky (HSC) se spolu s myofibroblasty (MF) a endotelovými buňkami aktivují, což vede k produkci metaloproteinů (MMP) schopných

degradovat složky bazální membrány. Tím se usnadní přístup k poškozené tkáni fagocytujícím makrofágům a neutrofilním granulocytům (Yang, 2003). Poškozená tkáň se nahrazuje, a to v prvních dnech plasmatickým fibrinem. HSC a MF využívají své schopnosti kontrakce pro migraci podél fibrinových vláken do místa postižení, kde produkují cytokiny a složky extracelulární matrix, zejména kolagen typu I, a nahrazují nepřilíš pevnou provizorní fibrinovou matrix jizvou s převahou kolagenu.

Po akutním poškození dochází při odeznění zánětu k reparaci poškozené tkáně. V případě, že působení noxy trvá, dochází k nadměrné akumulaci patologické matrix, HSC a MF proliferují, dochází k parakrinní i autokrinní aktivaci buněk především díky transformačnímu růstovému faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), k podpoře jejich dělení a další produkci kolagenu typu I (Olaso, 1998). Výsledkem je porucha homeostázy ECM, při čemž produkce převažuje nad degradací proteinů ECM. Dochází ke změně uspořádání buněk sinusoid, k tzv. kapilarizaci, změně fenotypu a ztrátě fenestrace endotelových buněk, což vede ke zhoršené výměně látek mezi krevním oběhem a hepatocyty (Ramadori, 1998).

Rozvinutá jaterní fibróza přechází do cirhózy, zvyšuje se odpor v jaterním řečišti a vzniká portální hypertenze. Výsledkem je přestavba jaterní tkáně s typickými regeneračními uzly obklopenými vazivovými septy.

Dříve se jaterní fibróza považovala za nevratný proces. V posledním desetiletí experimentální práce i klinické studie hovoří o opaku. V roce 1998 Iredale publikoval zásadní práci, naznačující možnost částečné reparace jaterní fibrózy. U potkanů navodil fibrózu opakovaným podáváním CCl_4 , což prokázal histologicky, játra části zvířat pak analyzoval měsíc po ukončení podávání CCl_4 a zjistil částečnou regresi poškození. Histologický obraz byl normální, obsah hydroxyprolinu se snížil na hladinu srovnatelnou se zdravými zvířaty, stejně tak došlo k poklesu mRNA kolagenu typu 1, tkáňového inhibitoru metaloproteinas 1 a 2 (TIMP-1 a -2). Prokázán byl také úbytek α -SMA (α -aktin hladké svaloviny) pozitivních buněk a jejich apoptóza. Podobné výsledky publikoval i Issa (2001, 2004) u potkanů po zprůchodnění žlučovodu. Regrese fibrózy – na rozdíl od pokročilé cirhózy - byla zdokumentovaná i u pacientů s hepatitidou C, autoimunitní hepatitidou, alkoholickou i nealkoholickou steatohepatitidou po úspěšné léčbě nebo odstranění příčiny (Povero, 2010).

3.2.2. Morfologická klasifikace jaterních cirhóz

Jaterní cirhózu můžeme rozdělit dle morfologie, etiologie a funkce. Z morfologického hlediska rozeznáváme tři základní druhy cirhóz: portální, postnekrotickou a biliární. Liší se od sebe histologickým obrazem a etiologií (Pelikán, 1973). Portální cirhóza je charakterizována

v počátku velkým množstvím tuku v jaterních buňkách, vznikem pseudolobulů, u kterých není vena centralis uprostřed, je zatlačena k okraji lalůčku nebo úplně chybí. Regenerační hyperplastické uzly jsou ohraničené různě širokými pruhy vaziva, které obsahují změněné portobiliární prostory a pseudoduktuly. Ve vazivu se nachází lymfocytárně - plazmocytární infiltrát. V klidových fázích je vazivo málo buněčné, tvoří tenké pruhy, které neostře ohraničují hyperplastické pseudolobuly.

Postnekrotická cirhóza se vyvíjí po masivní difúzní nekróze jater, může se vyvinout i po opakovaných ložiskových nekrózách, např. při virové hepatitidě. Po masivní nekróze regenerují zbylé hepatocyty a vytvářejí se multilobulární uzly s nepravidelnými různě širokými jizvami. Při chronické hepatitidě postupně ubývá jaterní parenchym a zmnožuje se vazivo. Proces progreduje a často končí selháním jaterních funkcí.

Biliární cirhóza se vyvíjí při obstrukci extra- či intrahepatálních žlučových cest. Mimo městnání žluče se jako patologický faktor uplatňuje chronický zánět žlučovodů. V mikroskopickém obrazu vidíme rozšířené portobiliární prostory s novotvořenými žlučovody, zaniklý jaterní parenchym je nahrazen vazivem. Úbytek parenchymu nikdy nedosahuje takového stupně jako u portální cirhózy. V centrálních oblastech jsou viditelné hrudky zahuštěné žluče, tzv. žlučové válce, částečně fagocytované Kupfferovými buňkami (Brozman, Ondruš, 1976).

Z důvodů nejednoznačnosti diagnózy byla v roce 1974 navržena nová klasifikace, která dělí cirhózu z morfologického hlediska na mikronodulární, makronodulární, smíšenou a multilobulární (Galambos, 1975). Mikronodulární cirhóza se vyznačuje pravidelnými septy a malými regeneračními uzly. Makronodulární cirhóza je často pozdním typem cirhózy mikronodulární, charakteristické jsou pro ni nestejná tloušťkou sept i nodulů a výskyt normálních lalůček uvnitř větších uzlů (Příbramská, 2007).

Popis jaterní cirhózy na základě velikosti uzlů není v dnešní době dostatečný, cílem je stanovení diagnózy na základě etiologie. Kromě jaterní biopsie, která je zlatým standardem, se pro hodnocení stavu fibrózy využívají i neinvazivní metody - biochemická vyšetření sérových biomarkerů fibrózy a radiologické metody. K hodnocení funkčního stavu jater se běžně používá Child-Pughova klasifikace, zohledňující laboratorní ukazatele - hladiny albuminu, bilirubinu a protrombinový čas a klinické parametry - přítomnost ascitu, encefalopatie (Ehrmann, Hůlek, 2010).

3.2.3. Experimentální modely jaterní fibrózy a cirhózy

Pro zkoumání patofyziologie jaterní fibrózy a látek s antifibrogenním potenciálem se využívá převážně potkanů kmenů Wistar a Sprague Dawley, v posledních letech se stále více objevují studie využívající transgenní myší modely.

Toxické poškození jater se navozuje například tetrachlormethanem, jehož podání modeluje postnekrotickou fibrózu. Thioacetamid, dimethylnitrosamin nebo podvázání žlučovodu slouží k vyvolání sekundární biliární fibrózy. Nevýhodou podvázání žlučovodu je reverzibilita histologických změn po rekanalizaci žlučových vývodů a vysoká mortalita zvířat. Autoimunní hepatitidu lze vyvolat podáním heterologního séra, nealkoholové ztukovatění jater dietou bez cholinu a methioninu (Brenner, 2009).

V naší práci jsme použili tetrachlormethan (CCl_4). Ten je metabolizován v játrech cytochromem P450 na toxický volný radikál $\text{CCl}_3\cdot$. Reakcí radikálu $\text{CCl}_3\cdot$ s kyslíkem vzniká ještě reaktivnější radikál $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$. Tyto radikály mohou přímo reagovat s nenasycenými mastnými kyselinami buněčných membrán nebo organel či s jinými buněčnými komponentami, což vede k další tvorbě volných radikálů a produktů peroxidace, k poškození lipidů, nukleových kyselin a dalších důležitých molekul. Hepatotoxicita tetrachlormethanu je potencována látkami, které indukují izoenzymy cytochromu P450, např. fenobarbital. Změny v jaterní tkáni připomínají alkoholové poškození jater u člověka. V počátku jde o zánět a masivní nekrózu hepatocytů přecházející v steatózu a centrilobulární nekrózy, později septální fibrózu až rozvoj cirhózy po opakovaném podávání tetrachlormethanu (Tamayo, 1983). V poslední fázi jsou tyto změny do značné míry ireverzibilní. Intragastrické podávání je nejefektivnější v porovnání s podáváním podkožním, intraperitoneálním nebo inhalačním.

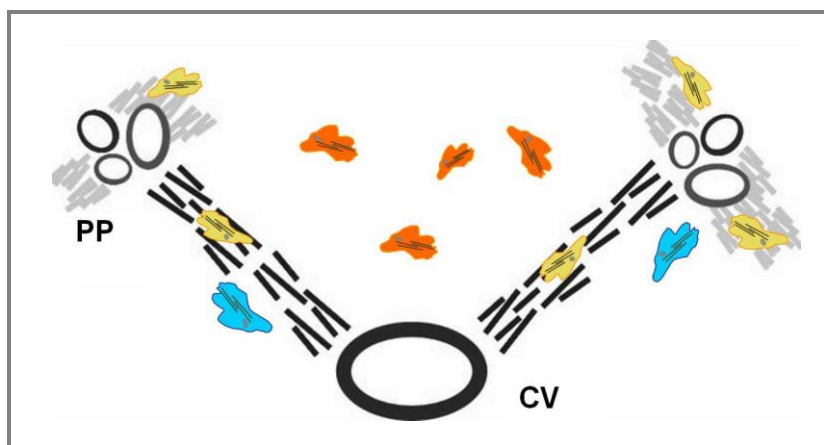
3.3. JATERNÍ MYOFIBROBLASTY

Poškození tkáně vede k zánětlivé odpovědi a k její náhradě provizorní ECM. Nejprve se formuje se granulační tkáň, která slouží k vyplnění defektu, skládá se z kapilár, proliferujících fibroblastů a zánětlivého infiltrátu. Fibroblasty se mění, nabývají charakteru buněk hladkého svalu, cytoplasmě se objevují svazky mikrofilament a stresových vláken důležitých pro kontrakci a migraci buněk. Takové buňky se nazývají myofibroblasty. Změna v zastoupení cytoskeletálních proteinů se využívá k jejich charakterizaci. První typ buněk, který byl popsán jako zdroj myofibroblastů v játrech, byly HSC. Dosud jsou také nejvíce studovanou populací MF.

3.3.1. Historie, nomenklatura HSC a MF

Ito v roce 1952 popsal neparenchymový typ buněk a nazval je „fat storing cells“. Bronfenmajer v roce 1968 přejmenoval tyto buňky na lipocyty na základě jejich role v metabolismu vitamínu A a tuků. V současné době se používá jednotný název jaterní hvězdicové buňky (hepatic stellate cells - HSC) namísto dříve používaných termínů Itovy buňky a jaterní lipocyty (Ramadori, 2002). Aktivovaným HSC (tzn. α -SMA pozitivním) se také říká myofibroblasty. V posledním desetiletí se začaly objevovat práce zabývající se jaterními MF, které se od HSC liší lokalizací v jaterním lalůčku a také expresí cytoskeletálních markerů. Jedná se o portální, septální a tzv. interface myfibroblasty. Jejich lokalizaci schematicky znázorňuje Obr. č. 2.

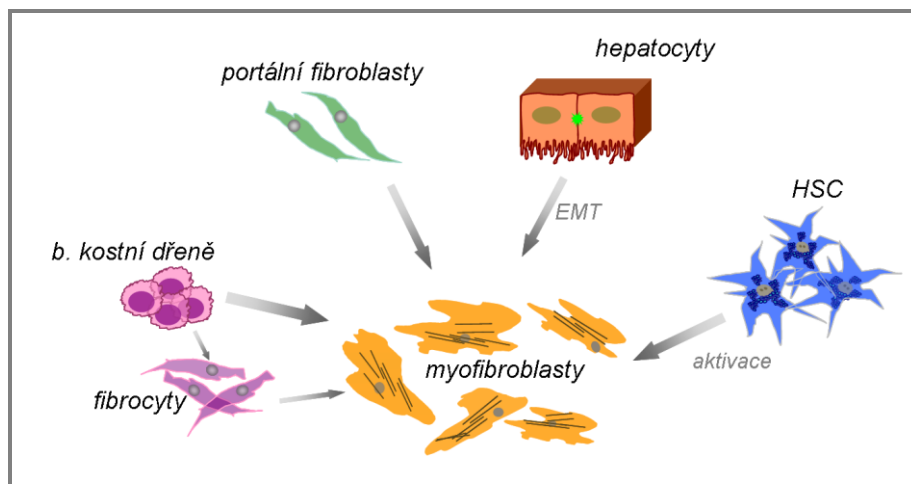
Portální fibroblasty (pMF) se nacházejí v ECM portobiliárním prostoru jaterního lalůčku, aktivují se při ischemii a městnání žluči. Exprimují stejné cytoskeletální antigeny jako septální MF (sMF), které se nacházejí uvnitř vznikajících vazivových sept. Interface MF (iMF) se vyskytují na rozhraní portobiliárního prostoru a parenchymu nebo na rozhraní vazivových sept a parenchymu (Cassiman, 2002).



Obrázek č. 2: Schéma jaterního lalůčku s vazivovým septem mezi v. centralis (CV) a portobiliárním prostorem (PP). Modře jsou znázorněny iMF, žlutě p,sMF a oranžově HSC/MF.

Z hlediska fibrogenese nás nejvíce zajímají myofibroblasty pocházející z HSC - někdy označované jako HSC/MF. Nacházejí se v okolí sinusoid, považují se za hlavní fibrogenní buňky jater, i když i ostatní typy MF mají tento potenciál (Ijzer, 2006). Je třeba zmínit i práce popisující ve fibrotických játrech výskyt MF s extrahepatálním původem; ať už z fibrocytů z kostní dřeně - cirkulujících prekurzorů mezenchymálních buněk (Kisseleva, 2006) anebo mezenchymálních kmenových buněk (Forbes, 2004). Diskutuje se i vznik MF přeměnou z hepatocytů, tzv. epithelial-mesenchymal cell transition (Zeisberg, 2007), kterou však jiní autoři

nepovažují za možnou (Taura, 2010). Relativní zastoupení MF vzniklých jinou cestou než aktivací HSC je stále předmětem zkoumání.



Obrázek č. 3: Možné buněčné zdroje MF v játrech jsou HSC, hepatocyty (díky přeměně epitelu na mesenchymovou buňku tzv. epitelial-mesenchymal cell transition), pMF, buňky kostní dřevě.

3.3.2. Funkce HSC v normálních játrech

Ve zdravých játrech je nejdůležitější funkcí HSC skladování vitamínu A. Fyziologicky je v nich uloženo až 85 % celkových zásob vitamínu A (Gressner, 2008). Estery retinolu rozpuštěné v tucích potravy jsou emulgovány žlučovými kyselinami, hydrolyzovány ve střevní sliznici a následně vstřebány do střevního epitelu, kde je přijímaný retinol opět esterifikován a transportován v chylomikronech lymfatickými cévami do krevního oběhu. Chylomikronové zbytky i s estery retinolu jsou vychytávány játry. V játrech je vitamin A ukládán do zásoby do HSC (v malém množství i do hepatocytů) pravděpodobně jako lipoglykoproteinový komplex. Pro transport do tkání je komplex hydrolyzován a retinol navázaný na retinol vázající protein (RBP) a vylučován do plasmy. V plasmě se také v malém množství vyskytuje retinová kyselina vázaná na albumin (Blaner, 2009). Periferní buňky vychytávají komplex retinol-RBP pomocí receptorů STRA6 (Blaner, 2007), které retinol oddělí a přenesou do nitra buňky, kde je enzymaticky oxidován na retinal a retinovou kyselinu. Faktu, že HSC obsahují tukové kapénky, poprvé využil k izolaci buněk De Leeuw (1984). Po rozrušení jaterní struktury perfuzí pronasou a kolagenasou využil centrifugaci v hustotním gradientu.

Aktivace HSC na MF je provázána ztrátou tukových kapének obsahujících retinol. Masivní uvolnění retinoidů z buněčných zásob může díky transkripčním faktorům, receptorům pro kyselinu retinovou (RAR a RXR) a jejich vazbě na promotory označované jako RARE (retinoic acid response element), ovlivnit expresi celé řady genů v HSC např. prokolagenu typu I, III, IV a lamininu (Hellemans, 1999). Není dosud zcela jasné, zda je ztráta retinoidů nezbytná pro aktivaci HSC nebo naopak je jejím důsledkem.

HSC se řadí mezi tzv. buňky prezentující antigen (APC). Mají též schopnost diferencovat se v progenitorové buňky endotelu a hepatocytů (Gressner, 2008).

3.3.3. Aktivace HSC

Proces aktivace HSC je klíčovým bodem fibrogenese v játrech. Rozumíme jím zvýšenou proliferaci HSC a změnu jejich fenotypu. Z HSC se stanou MF schopné syntetizovat ECM, pro- i protizánětlivé cytokiny a růstové faktory, metaloproteinasy a jejich inhibitory. Pro zjednodušení popisu tohoto složitého procesu Friedmann zavedl jeho rozdělení na dvě fáze: iniciaci, kdy změny fenotypu HSC jsou závislé na stimulaci okolními buňkami a signálními molekulami a perpetuaci, kdy se samy HSC udržují v aktivovaném stavu.

Iniciace

Iniciace, která předchází zánětlivé reakci, vede k rychlým změnám v genové expresi a změně fenotypu HSC díky parakrinní stimulaci. Hepatocyty a Kupfferovy buňky jsou významným zdrojem ROS (Gressner, 1995), díky indukci monooxygenasy cytochromu P450 (CYP 2E1) v hepatocytech a NADPH oxidasy fagocytujících Kupfferových buněk a HSC (De Minicis, 2007). Jejich aktivita je v poškozených játrech navíc zesílena absencí přirozených antioxidantů (např. glutathion). Zvýšená exprese cytochromu CYP 2E1 v HSC stimuluje expresi genu pro kolagen I (Baroni, 1998).

Kupfferovy buňky, hepatocyty, endoteliální buňky a krevní destičky vytvářejí TGF- β 1, který stimuluje produkci ECM proteinů, kolagenu typu I, III, IV (Gressner, 2002) i nekolagenních makromolekul ECM elastinu, tenascinu, osteonektinu, biglykanu a dekorinu. Snižuje jejich degradaci metaloproteinasy, intersticiální kolagenasou (MMP-1) a stromelysinem (MMP-3), zvýšením tvorby tkáňového inhibitoru metaloproteinasy TIMP. Brzdí regeneraci hepatocytů snížením produkce růstového faktoru hepatocytů (HGF).

Poškození endotelových buněk stimuluje produkci tkáňového fibronektinu, který následně stimuluje HSC (Jarnagin, 1994). Endotelie také pomáhají konvertovat latentní formu TGF- β 1 v aktivní, fibrogenní formu, pomocí aktivace plasminem (Friedman, 2000). Destičky produkují destičkový růstový faktor (PDGF), TGF- β 1 a epidermální růstový faktor (EGF) (Bachem, 1989).

Perpetuace

Již aktivované HSC podléhají dalším změnám souhrnně označovaným jako perpetuace. Ta zahrnuje proliferaci, zvýšení kontraktility, fibrogenezi, chemotaxi, degradaci matrix, ztrátu retinolu a produkci cytokinů.

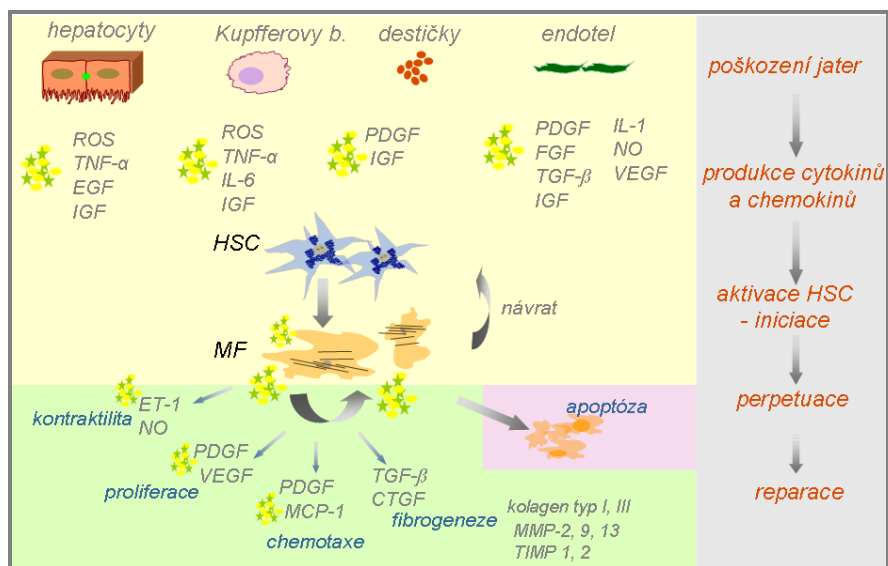
Aktivované HSC exprimují na svém povrchu řadu specifických membránových receptorů, např. receptor pro TGF- α , TGF- β 1 a EGF (Li, 2001), dále pak receptor pro PDGF a cévní endoteliální růstový faktor (VEGF). Efekt dalšího z receptorů, receptoru pro endotelin 1 (ET-1), je zprostředkován dvěma s G-proteinem spojenými receptory ETA a ETB přítomnými jak v klidových, tak i v aktivovaných HSC (Kawada, 1995). ET-1 má v klidových HSC prostřednictvím ETA receptoru proliferativní efekt (Pinzani, 1996), zatímco ETB zprostředkovává kontrakci a inhibici růstu (Rockey, 1995).

Počet HSC stoupá díky účinkům mitogenních faktorů, které působí přes receptory spojené s tyrosinkinasou. Nejvýznamnějším růstovým faktorem je PDGF, aktivované HSC exprimují PDGF receptor (Friedman, 2000). Dalšími mitogenními faktory jsou VEGF (Yoshiji, 2003), trombin, EGF, TGF- α a růstový faktor fibroblastů (bFGF) (Bataller, 2005). Lokálně se počet HSC zvyšuje proliferací a také jejich migrací směrem k poškozeným místům. PDGF byl popsán také jako hlavní chemoatraktant aktivovaných HSC (Kinnman, 2000), mezi dalšími to jsou např. faktor stimulující kolonie (CSF) a monocytární chemotaktický peptid (MCP-1) (Marra, 1999).

HSC produkují celou řadu složek ECM, nejvýznamnějším proteinem fibrotických jater je kolagen typu I. Exprese mRNA prokolagenu typu I vzrůstá až 60 násobně a je regulována transkripčními faktory jako jsou NF- κ B či KLF (Kruppel-like factor). Mezi profibrogenní cytokiny patří kromě zmiňovaného TGF- β 1 růstový faktor pojivové tkáně (CTGF), jehož hlavním zdrojem v játrech jsou hepatocyty a také aktivované HSC. Zatímco v hepatocytech je exprese CTGF závislá na TGF- β 1, v HSC má klíčový vliv endotelin ET-1 (Gressner, 2007).

Zánik

Během fáze hojení se snižuje absolutní počet HSC, přičemž jednou z možných cest zániku HSC je apoptóza. Apoptóza je řízená buněčná smrt, při které dochází intracelulárně k proteolýze díky aktivaci enzymů kaspas. Výsledkem je fragmentace DNA a morfologické změny jako je kondenzace jádra, bobtnání cytoplasmatické membrány a vznik apoptotických tělísek, které jsou pohlcovány okolními fagocytujícími buňkami. Vnější cesta aktivace apoptózy vede přes receptory smrti (Fas a TNFR-1). Aktivované HSC exprimují na svém povrchu Fas receptor i Fas ligand, může u nich docházet k autokrinní aktivaci apoptózy (Saile, 1997). Aktivované HSC jsou náchylnější k apoptóze vyvolané in vitro nedostatkem séra ve srovnání s klidovými HSC (Murphy, 2002). HSC během aktivace podléhají apoptóze paralelně s expresí p53, Bcl-2, CD 95L (Fas ligand).



Obrázek 4: Schéma: vliv cytokinů a chemokinů Kupfferových buněk, hepatocytů, endoteliální buněk, krevních destiček na aktivaci HSC na MF. Autokrinní stimulace MF.

Některé profibrogenní cytokiny působí jako tzv „surviving factors“. Při poškození jater hepatocyty a HSC produkují IGF, díky jeho antiapoptickému vlivu je zajištěno přežití HSC. Antiapopticky působí i TNF- α a TGF- β (Saile, 1999), o které také není v poškozených játrech nouze, zřejmě díky snížené expresi CD95L a zásahem do exprese bcl, p53 a NF- κ B (Saile, 2001).

MMP se účastní regulace apoptózy díky své schopnosti štěpit extracelulární domény buněčných receptorů (pro i protiapoptických). MMP se mohou inhibovat prostřednictvím TIMP-1, jehož hladina je při fibróze zvýšená, což může působit antiapopticky na aktivované HSC (Murphy, 2002). Také složení ECM ovlivňuje apoptózu HSC.

3.3.4. Morfologie a imunocytochemická charakterizace HSC a myofibroblastů

HSC mají vřetenovitá těla s oválným podlouhlým jádrem, mírně vyvinutým drsným endoplasmatickým retikulem, malým Golgiho komplexem a nápadně dlouhými rozvětvenými cytoplasmatickými výběžky. Ty sahají až pod endotelové buňky a obtáčejí se kolem sinusoid. Na lumenální straně procházejí výběžky Disseho prostorem až k hepatocytům. Výběžky sahají k nervovým zakončením, která se částečně podílí na vazoregulaci (Li, 2001). Během jaterního poškození se struktura HSC mění, s aktivací se zvyšuje produkce proteinů, s tím souvisí zvětšení drsného endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu.

Ve zdravých játrech lze HSC prokázat perisinusoidálně pomocí imunocytochemického barvení na kyselý gliový fibrilární protein (GFAP), fibulin 2 a také nespecificky na desmin. Desmin obsahují i MF, v lidských játrech desmin detekován nebyl. Po aktivaci se HSC/MF

barví na α -SMA a neurální adhezní protein (N-CAM). α -SMA ve zdravých játrech můžeme detekovat jen v pMF, které jsou na rozdíl od HSC GFAP negativní (Knittel, 1999). Pro úplnost uvádím přehlednou tabulku exprese cytoskeketálních markerů HSC a MF ve zdravých a cirhotických játrech.

Marker	Zdravá játra		Cirhotická játra	
	HSC	pMF	HSC/MF	p,sMF
Desmin	+++	+++	+++	++
GFAP	+++	0	++	+
α -SMA	0	+++	++	+++
N-CAM	0	+	++	+++
Fibulin 2	+	+++	+	+++

Tabulka č. 1: Exprese cytoskeketálních markerů HSC a MF ve zdravých a cirhotických játrech potkanů (podle Knittel,1999, a Cassiman, 2002, zkráceno).

Prozatím není vyřešena otázka původu HSC. Na základě exprese GFAP, nestinu a synaptofyzinu se polemizuje o HSC jako o buňkách s původem v neurální liště (Buniatin, 1996; Niki, 1999; Cassiman,1999). HSC však exprimují markery typické pro buňky kostní dřeně ICAM, CD-40 (Baba. 2004). Tato otázka zůstává zatím nevyřešena.

Izolace HSC s použitím hustotního gradientu je obecně přijímanou metodou (Ramadori, 2002). Neparenchymová buněčná frakce kromě klidových HSC obsahuje i MF (Knittel, 1999; Ogawa, 2007). HSC se kultivací aktivují, ale jejich proliferační potenciál je omezený, udává se, že jsou schopné přežít 2 pasáže. Naopak MF lze kultivovat i po opakované pasáži (Kim, 2005). Pouze klidové HSC exprimují GFA. HSC po aktivaci obsahují α -SMA a většinou i desmin. MF exprimují také α -SMA, fibulin-2 ale desmin jim chybí (Knittel, 1999; Ogawa, 2007).

3.3.5. Vliv kultivačního prostředí na HSC a jaterní myofibroblasty

Podrobné studium chování HSC bylo umožněno po zavedení enzymatické perfuze jater, kdy dojde k rozrušení tkáně pronasou a kolagenasou, s následnou izolací HSC na hustotním gradientu. Některá pracoviště využívají k separaci frakcí neparenchymových buněk jater elutriaci (centrifugace, kdy proti odstředivé síle působí průtok analyzovaného materiálu v dostředivém směru).

Všeobecně uznávaný model pro aktivaci HSC in vitro je kultivace na plastických Petriho miskách v mediu se sérem, aktivaci lze urychlit přidáním cytokinů nebo růstových faktorů jako např. PDGF, TGF- β 1 (Bachem, 1992). Po několika dnech dochází k morfologickým

a funkčních změnám nazývaným aktivace. Aktivace zahrnuje změnu fenotypu cytoskeletálních proteinů, expresi α -SMA, ale i podstatnou změnu v expresi řady genů podporujících fibrogenезi v játrech. Aktivaci HSC ovlivňují nejen cytokiny a růstové faktory, ale i proteiny extracelulární matrix vazbou na integriny a následnou aktivací signalizačních kaskád. Klíčová není jen pouhá přítomnost proteinů matrix (kultivace na potažených miskách) ale i trojrozměrná struktura (gely různého složení) a její mechanické vlastnosti. Z toho důvodu se řada studií zabývá vlivem kultivačního prostředí na chování buněk.

Aktivované HSC kultivované na plastu, nebo kolagenem typu I potažených miskách mají polygonální tvar s viditelnými stresovými vlákny. Buňky kultivované v kolagenním gelu se vyznačují dlouhými větvenými výběžky (Sato, 2003). Matrigel, mezibuněčná hmota produkovaná buňkami Engelbreth-Holm-Swarmova (EHS) sarkomu, obsahující mimo jiné kolagen typu IV a laminin, udržuje HSC v neaktivovaném stavu (Uemura, 2005) jak z morfologického hlediska - buňky zůstávají oválné (Sato, 2004), tak je utlumena i exprese markerů aktivace α -SMA, prokolagenu I, TIMP-1 (Gaca, 2003). Matrigel snižuje proliferaci HSC, dokáže je přechodně deaktivovat, po zpětném vysazení na plastik se buňky znovu aktivují a exprimují α -SMA a prokolagen typu I.

Potažení kultivačních misek kolagenem typu I zvyšuje proliferaci buněk a syntézu kolagenu v HSC (Senoo, 1994), zatímco přítomnost kolagenu typu IV zvyšuje esterifikaci retinolu, v menší míře stimuluje produkci kolagenu (Senoo, 1998). Kolagenní gel typu I stimuluje expresi MMP-13 v lidských fibroblastech (Vaalamo, 1997). HSC v kolagenním gelu exprimují více mRNA metaloproteinů MMP-2, MMP-14 (Théret, 1999; Wang, 2003) a jejich inhibitoru TIMP-2, ale méně MMP-13 než buňky na samotném polystyrenu, polystyrenu pokrytém kolagenem I nebo v Matrigelu (Wang, 2003). Jiní autoři detekovali zvýšenou expresi mRNA MMP-3, -9, -13 a sníženou expresi mRNA uPA v HSC v kolagenním gelu typu I, exprese MMP-9 klesla po přidání protilátky proti integrinu $\alpha 2\beta 1$ nebo inhibitorů tyrosin kinasy (Takahara, 2003).

Také další složky extracelulární matrix ovlivňují chování různých typů buněk. Elastin byl studován hlavně v souvislosti s buňkami hladkého svalstva v arteriích. Bylo zjištěno, že ovlivňuje proliferaci buněk i jejich fenotyp (Yamamoto, 1993; Li, 1998). Elastin se hromadí v septech cirhotických jater (Kanta, 2002). O fibrinu bylo prokázáno, že se nachází v lezích v poškozených játrech (Neubauer, 1995) a v podobě trojrozměrného gelu má schopnost snížit genovou expresi prokolagenu typu I ve fibroblastech (Pardes, 1995).

3.4. SLOŽENÍ JATERNÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A JEJÍ DEGRADACE

Jaterní extracelulární matrix (ECM) tvoří nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně. I když ECM zaujímá ve zdravých játrech méně než 3 % (vztaženo na relativní plochu řezu, Bedossa, 2003), její kvantitativní i kvalitativní změny mají přímý vliv na jaterní funkci. ECM poskytuje přítomným buňkám mnoho signálů nutných k udržení polarity, migraci, proliferaci a diferenciaci, například vazbou na integriny a aktivací signalizačních kaskád. ECM slouží také jako rezervoár cytokinů a růstových faktorů, které mohou být při remodelaci uvolněny.

Normální i patologická ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty (glykoproteiny a proteoglykany). Hlavním nesolubilním fibrózním proteinem v tkáních je kolagen, v cirhotických játrech převažuje typ I. Nekolagenní komponenty extracelulární matrix lze rozdělit na proteoglykany, glykoproteiny (fibronectin, laminin, tenascin) a kyselinu hyaluronovou (Obr. č. 5). Hlavním zdrojem ECM v normálních i poškozených játrech jsou HSC a MF, do určité míry se uplatňují i jaterní endotelové buňky (zejména v počáteční fázi fibrózy tvorbou buněčné formy fibronectinu) a možná i hepatocyty.

3.4.1. Kolageny a elastin

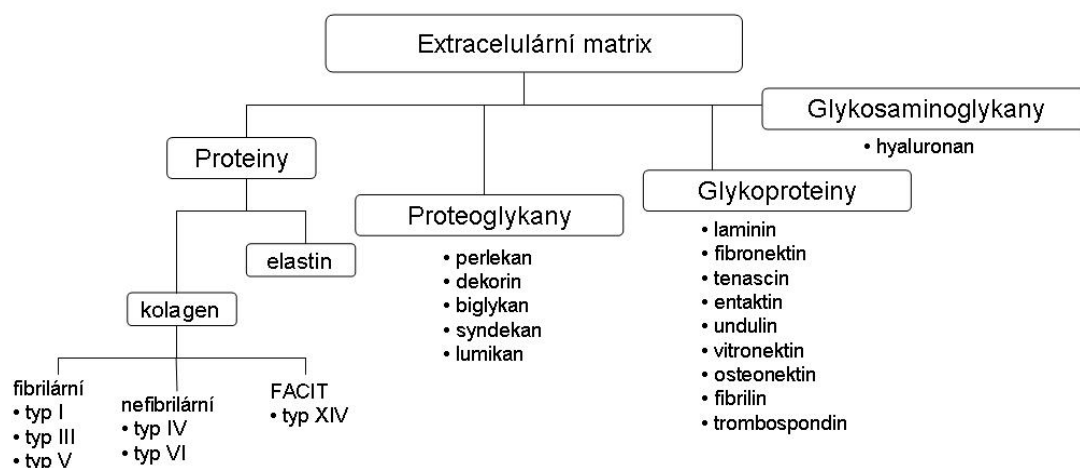
Kolagen patří v organismu mezi nejrozšířenější proteiny (tvoří až 25 % všech bílkovin v organismu). Vlákno kolagenu vytváří trojpramennou šroubovici. Primární aminokyselinová sekvence řetězce je GLY-X-Y (celkem 1050 aminokyselinových zbytků), každá třetí aminokyselina je glycin, X je často prolin, Y je často hydroxyprolin. Nascentní řetězec kolagenu podléhá řadě posttranslačních modifikací. Prolin je hydroxylován za účasti Fe^{2+} , 2-oxotoglutarátu a vitamínu C prolyl-4-hydroxylasou nebo prolyl-3-hydroxylasou na hydroxyprolin. Hydroxylace prolinu je nutná pro stabilizaci trojšroubovice. Analogickou reakcí se posttranslačně vytváří na stejné Y pozici i hydroxylysin, reakce vyžaduje přítomnost enzymu lisyloxidasy. V průběhu maturace kolagenu dochází nejen ke glykosylaci některých posttranslačně vytvořených hydroxylysinů, ale vzniká celá řada příčnovazebných elementů, které jsou podstatou stárnutí kolagenu. Za zesíťování kolagenu jsou zodpovědné enzymy tkáňová transglutaminasa, která tvorbou ϵ -(γ -glutamyl lysinu) zvyšuje odolnost kolagenu proti proteolytickým enzymům. Dále je to lysyl oxidasa, která oxidativně deaminuje lysin a hydroxylysin za vzniku aldehydu.

Dosud bylo identifikováno 19 různých typů kolagenů (typ I až XIX). Typy I, II a III jsou zastoupeny nejvíce, jejich sdružené molekuly vytvářejí fibrily. Kolagen typu IV je součástí

bazálních membrán. Základní strukturální jednotkou kolagenu je trojitá šroubovice. Tři řetězce v kolagenu jsou buď identické, vzniká homotrimer, případně jsou řetězce odlišné, vzniká heterotrimer, kde jsou dva identické řetězce $\alpha 1$ a jeden odlišný řetězec $\alpha 2$. Kolagen typu I (80-90 % všech kolagenů) tvoří v těle heterotrimer $[(\alpha 1(I))_2(\alpha 2)]$ (Masopust, 2003).

Hlavním strukturálním proteinem ECM v normálních i cirhotických játrech je kolagen. Zastoupeny jsou jak fibrilární kolageny (typ I, III, V), tak nefibrilární kolagen typu IV, který spolu s lamininem a entaktinem tvoří podél sinusoid mezibuněčnou hmotu o nízké hustotě připomínající složením bazální laminu. Nízká hustota mezibuněčné hmoty ve zdravých játrech umožňuje efektivní výměnu látek mezi buňkami a krví.

Elastin je zodpovědný za hydrofobní elastické vlastnosti tkáně. Amorfní elastin vzniká polymerací tropoelastinu, který agreguje tvorbou příčnovazebného elementu desmosinu. Elastinová vlákna jsou pokryta mikrofibrilami, tvořenými různými glykoproteiny, především fibrilinem.



Obrázek č. 5: Složení extracelulární matrix. (upraveno podle Gressnera, 2004).

3.4.2. Proteoglykany a glykoproteiny

Proteoglykany (PG) jsou velmi různorodá skupina proteinů, které mají kovalentně navázané glykosaminoglykanové zbytky. Glykosaminoglykany (GAG) se skládají z opakujících se disacharidových podjednotek, které obsahují uronovou kyselinu (D-glukuronovou nebo L-iduronovou) a aminocukry (N-acetyl-D-glukosamin nebo N-acetyl-D-galaktosamin). Sulfátové skupiny modifikující cukerné zbytky a spolu s karboxylovými skupinami poskytují silné negativní náboje, což způsobuje přitahování osmoticky aktivních kationtů a posléze vody díky čemuž proteoglykany a GAG vytváří silně hydratovaný gel.

Nomenklatura proteoglykanů je založena buď na převládající GAG složce, nebo podle výskytu. V játrech jsou zastoupeny proteoglykany (PG) v podobě heparan sulfátu (HSPG),

dermatan sulfátu (DSPG) a chondroitin sulfáty (CSPG). HSPG bazální laminy se označuje jako perlekan, HSPG na povrchu buněk jako syndekan. Významný je i dekorin, na leucin bohatý CSPG a DSPG, asociovaný s kolagenem. Podobnou strukturu má i biglykan. Heparan sulfát interaguje s celou řadou proteinů na povrchu buněk, proteinů ECM, růstových faktorů a cytokinů a ovlivňuje buněčnou adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci.

Kyseliny hyaluronová (HA) patří mezi GAG, je důležitou součástí většiny tkání. Její produkce v játrech se zvyšuje při zánětu, stejně tak je to s produkcí kolagenu. Roste také její koncentrace v séru, to může být způsobeno snížením počtu receptorů pro HA na endotelových buňkách sinusoid (postižených tzv. kapilarizací), které za normálních okolností HA vychytávají a degradují ji v lysozomech (Suzuki, 2005). Měření sérové hladiny HA se využívá jako jeden z neinvazivních markerů jaterní fibrózy.

Z glykoproteinů jsou zastoupeny laminin, fibronectin, tenascin, entaktin, fibulin a osteonektin. Fibronectin vytváří granule nebo tenká filamenta asociovaná s kolagenními vlákny.

Pro trombospondin, osteonektin, tenascin a proteiny z rodiny CCN se užívá název matricelulární proteiny. Jsou to proteiny ECM, které, jak se zdá, neplní ani tak strukturální roli jako spíše roli signalizační. Váží se na buněčné receptory, interagují s proteasami, hormony i se strukturálními proteiny ECM. Jejich exprese je vysoká během embryonálního vývoje a v dospělosti za patologických okolností (Bornstein, 2009).

Ve zdravých játrech se HSC vyskytují perisinusoidálně v Disseho prostoru obklopené matrix obsahující kolagen typu IV, laminin a fibronectin. Změna zastoupení jednotlivých složek ECM ve fibrózních játrech se odrazí i na změně fenotypu HSC a ostatních buněk (buňky endotelu sinusoid, epitelové buňky žlučových kanálků). V počáteční fázi fibrogenese se v oblastech postižených zánětem a nekrózou hromadí fibrin, fibronectin a tenascin a tvoří provizorní matrix, která je činností synteticky aktivních buněk přeměněna na septa s převahou kolagenu. Fibrotická játra obsahují tři až pětkrát více mezibuněčné hmoty tvořené z velké části sítí fibrilárních kolagenů I a III. Fibrotická septa také obsahují laminin, entaktin a kolageny typu IV, V, VI. Mezi glykosaminoglykany ztrácí hyaluronan převahu (Ramadori, 1998).

3.4.3. Receptory proteinů ECM – integriny

Většina molekul ECM vytváří signály, které jsou pomocí specifických buněčných receptorů integrinů převáděny do nitra buňky, kde aktivují řadu proteinkinás, následně ovlivňují transkripci genů a tím proliferaci, diferenciaci a přežití buněk.

Integriny jsou heterodimery procházející buněčnou membránou. Jsou tvořené podjednotkami α a β , které připojují makromolekuly ECM přes membrány k buněčnému skeletu. Dosud bylo popsáno 16 typů podjednotek α a 9 typů podjednotek β , které se kombinují do 24 typů integrinů (Imai, 2000). Extracelulární části integrinů jsou schopny rozpoznat a navázat se na adhezivní sekvence různých makromolekul ECM (např. sekvence RGD - Arg-Gly-Asp) a naopak proteiny ECM reagují hned s několika typy integrinů (Tab. č. 2).

Integriny		
podjednotky	ligandy	
β_1	α_1	<i>kolageny, laminin</i>
	α_2	<i>kolageny, laminin</i>
	α_3	<i>fibronektin, laminin</i>
	α_4	<i>fibronektin, VCAM-1</i>
	α_5	<i>fibronektin</i>
	α_6	<i>laminin</i>
	α_7	<i>laminin</i>
	α_v	<i>fibronektin, vitronektin</i>
β_2	α_L	<i>ICAM-1, ICAM-2</i>
	α_M	<i>C3b, fibrinogen, ICAM-1</i>
	α_X	<i>fibrinogen, C3b</i>
β_3	α_{IIb}	<i>fibrinogen, fibronektin, vitronektin, trombospondin</i>
	α_v	<i>jako α_{IIb} osteopontin, kolagen</i>

Tabulka č. 2: Přehled integrinů a jejich ligandů.

Bez zakotvení přes integriny a jiné receptory buňky nemohou přežít. Integriny aktivují nереceptorové tyrosinkinasy, např. fokální adhezivní kinasu (FAK) a kinasu rodiny Src (Mitra, 2006). FAK je propojena s β -podjednotkou integrinu, navázání proteinu ECM na integrin vede k její aktivaci, ta může být podpořena stimulací receptorů růstových faktorů jako např. bFGF, EGF nebo PDGF. FAK je spojena s proteiny talinem a paxilinem, sama ostatní proteiny nefosforyluje, po aktivaci dojde k autofosforylaci a váže Src kinasu (Imai, 2000). Signalizační kaskáda ECM – integrin – FAK ústí v aktivaci fosfatidylinositol kinas (PI3) a mitogenem aktivovaných proteinkinas (MAPK).

HSC exprimují řadu integrinů $\alpha\beta_1$, např. $\alpha_1\beta_1$ je receptorem pro kolagen typu IV a laminin, $\alpha_2\beta_1$ pro kolagen, laminin a fibronektin (Carloni, 1996). Vazba ligandu na integrin $\alpha_2\beta_1$ vede k indukci exprese MMP-9 v HSC kultivovaných v kolagenním gelu (Takahara, 2003).

V souvislosti s jaterní fibrózou se zkoumají také další typy tyrosinkinaseových receptorů pro kolageny, a to tzv. DDR receptory (discoidin domain receptors). Byly popsány dva typy DDR receptorů: DDR 1, vyskytující se na povrchu buněk epitelu různých tkání, a DDR 2, který exprimují buňky mezenchymálního původu. Autofosforylaci DDR 2 receptorů stimuluje

převážně fibrilární kolagen typu I, v menší míře také kolagen typu II, III, V. DDR 1 mohou být aktivovány navázáním kolagenů typu I, IV, V (Vogel, 2006). Receptory rozpoznají trojšroubovicovou strukturu nativního kolagenu, denaturovaný kolagen kinasovou aktivitu neindukuje. Aktivované HSC jako jediné mezi jaterními buňkami exprimují DDR 2 receptory. Fosforylovaná forma DDR2 receptoru nebyla ve zdravých játrech detekována. Zvýšená hladina mRNA i proteinu byla ale nalezena u potkanů v HSC aktivovaných *in vivo* po podání CCl₄ i v HSC aktivovaných *in vitro* kultivací na plastru. Zvýšená exprese i fosforylace DDR 2 se objevuje ve srovnání s přenosem signálů pomocí integrinů pomaleji (integriny reagují na cytokiny a růstové faktory, které předcházejí syntéze kolagenu) a má trvalejší charakter. DDR receptory se tedy účastní spíše pozdější fáze aktivace HSC, tzv. perpetuace, mají pozitivní vliv na proliferaci HSC a také na aktivaci MMP-2, která degraduje kolagen typu IV a urychluje přestavbu subendoteliální matrix (Olaso, 2001).

3.4.4. Degradace ECM – matrix metaloproteinasy a jejich inhibitory

Syntéza a degradace ECM je ve zdravých játrech udržována v rovnováze pomocí matrix metaloproteinasy (MMP), enzymů s omezenou a kontrolovanou proteasovou aktivitou, a jejich inhibitorů (TIMP). MMP patří spolu se serinovými, aspartátovými a cysteinovými proteasami mezi endopeptidasy. MMP mají doménovou strukturu obsahující N-terminální signální peptid, propeptid, katalytickou doménu zodpovědnou za substrátovou specifitu MMP obsahující vazebné místo pro Zn²⁺ a hemopexinovou doménu obsahující vazebné místo pro TIMP. Většina MMP je ve formě neaktivního propeptidu vylučována do mezibuněčného prostoru, některé tzv. membránové typy (MT-MMP) zůstávají ukotveny v buněčné membráně (Sternlicht, 2001). Podle substrátové specifity a podobnosti doménové struktury se dělí do několika skupin na kolagenasy, želatinasy, elastasy, stromelysiny a membránové MMP. Přehled MMP a jejich substrátů je uveden v tabulce č. 3, kde jsou kromě strukturních molekul ECM uvedeny cirkulující povrchové proteiny (Folgueras, 2004). U potkanů nebyla objevena homologní sekvence pro lidskou MMP-1, jejím funkčním ekvivalentem je MMP-13 (Okazaki, 2001). Aktivita MMP je regulována na úrovni transkripce i translace, na úrovni proteinů aktivací zymogenu a pomocí aktivátorů a inhibitorů MMP.

MMP hrají klíčovou roli při poškození jater a progresi jaterní fibrózy. Na expresi MMP a TIMP se podílejí hepatocyty, Kupfferovy buňky především při akutním poškození a HSC a MF při akutním a chronickém poškození přecházejícím do fibrózy. HSC *in vitro* exprimují celou řadu MMP a jejich inhibitorů TIMP. Produkce jednotlivých MMP se mění během kultivace. V primární kultuře neaktivované nebo částečně aktivované HSC (viz exprese

α -SMA) exprimují MMP-3 a MMP-13, zatímco TIMP-1, 2 nejsou detekovatelné. Hovoříme tedy o fenotypu HSC podporujícím degradaci matrix. Po akutním toxickém poškození jater jednou dávkou CCl₄ stoupá exprese MMP-2, 3, 9, 13, MT-1 MMP a TIMP-1, 2. Během procesu hojení se exprese MMP dramaticky snižuje s výjimkou MMP-2 a TIMP. Exprese MMP-13 je bifázická, ke stimulaci dochází v prvních hodinách akutního poškození. Jejimi producenty jsou částečně aktivované desmin pozitivní a α -SMA negativní HSC. Po čtyřtýdenním podávání CCl₄ při vznikající fibróze jater je pak produkce jen částečná v α -SMA pozitivních buňkách (Watanabe, 2000).

Narušení homeostázy matrix - ať už se jedná o změnu kvantitativní nebo kvalitativní – má dalekosáhlé důsledky. Proto MMP musí podléhat několikasupňové regulaci, a to na úrovni transkripce, aktivace proenzymu a blokování aktivity pomocí TIMP. Transkripční faktory NF- κ B a AP-1 vazbou na promotor genu pro MMP-9 zvyšují jeho expresi v aktivovaných HSC kultivovaných v kolagenním gelu, naopak Sp1 ji snižuje (Takahara, 2004).

Celá řada cytokinů a růstových faktorů ovlivňuje expresi genů pro MMP. TNF α stimuluje expresi MMP-3, 13, 10, v menší míře také MMP-9, 14 a TIMP-1 v HSC, klidové nebo pouze částečně aktivované HSC jsou na tuto stimulaci citlivější. TGF- β 1 nemá vliv na expresi MMP (kromě MMP-14 u které byla zjištěna upregulace) avšak expresi TIMP-1, 2 stimuluje (Knittel, 1999). TNF α se tedy uplatňuje v časně fázi odpovědi organismu na probíhající poškození jater, kdy dochází ke zvýšení exprese MMP jako např. u alkoholového poškození jater (ALD). S rozvojem onemocnění a přechodem k fibróze exprese MMP klesá a uplatňují se TIMP, zřejmě také pod vlivem TGF- β 1 (McClain, 2004). Také IL-6 má vliv na expresi MMP, na immortalizované buněčné linii HSC-T6 došlo ke snížení exprese MMP-2 po přidání rekombinantního IL-6 a IL-6 deficientní myši vykazovaly signifikantně vyšší expresi MMP-2 na úrovni mRNA i proteinu (Bansal, 2004).

Aktivátory plasminogenu (PA) jsou serinové proteiny schopné štěpit nejen plasminogen, ale také některé složky ECM a MMP. PA aktivuje intersticiální prokolagenasu, prostromelysin a proelastasu. Tento proces může být zablokovan inhibitory PA (PAI). Exprese PAI-1 roste s aktivací HSC v buněčné kultuře, u PAI-1-deficientních myši byla prokázána zlepšená regenerace jater (Benyon, 2001).

Aktivita MMP je regulována dvěma hlavními endogenními inhibitory α 2-makroglobulinem (A2M) a tkáňovými inhibitory metaloproteinás (TIMP). A2M je glykoprotein o molekulové hmotnosti 725 kDa. Tato endopeptidasa je přítomná v krvi a tkáňové tekutině a inhibuje různé typy proteinas. Vytváří s nimi komplex, který je následně vylučován endocytózou pomocí

LRP (LDL receptor related protein 1) na makrofágách, hepatocytech a fibroblastech (Murphy, 2008).

Dosud známe čtyři typy TIMP. TIMP-1 a TIMP-3 jsou glykoproteiny, TIMP-2 a TIMP-4 sacharidovou část v molekule neobsahují. Jsou to proteiny o molekulové hmotnosti 21 kDa (TIMP-2,4), 28 kD (TIMP-1) a 23 kDa (TIMP-3) složené z dvou domén - N a C terminálních (Benyon, 2001). TIMP inhibují široké spektrum MMP a také jiné proteasy. V aktivním místě katalytické domény MMP tvoří Zn^{2+} koordinační vazbu s dusíkem aminoskupiny a kyslíkem karboxyskupiny cysteinu na N-terminální doméně molekuly TIMP (Visse, 2003). Spektrum účinků TIMP a jejich uplatnění při fyziologických i patologických procesech je velmi široké. Mají nezastupitelnou roli při morfogenezi tkání (např. plíce, kost, mléčná žláza) při růstu, hojení ran, ale také při kardiovaskulárních chorobách, artritidě a rakovině (Murphy, 2008). TIMP inhibují různé typy MMP s rozdílnou účinností, TIMP-1 má nižší afinitu k MT1-MMP, MT3-MMP a MMP-19. TIMP-3 inhibuje také metaloproteinasy z rodiny ADAM a ADAMTS (Murphy, 2008). Na regulaci transkripce se podílejí cytokiny a růstové faktory TGF- β 1 a TNF α (Knittel, 1999b).

Vzestupem TIMP-1 a TIMP-2 jak na úrovni mRNA, tak proteinu jsou provázána chronická onemocnění jater - primární biliární cirhóza, chronická HCV infekce, sklerotizující cholangitis, chronická autoimunitní hepatitida (Hemmann, 2007). Sérové hladiny TIMP-1 u pacientů s chronickou HCV infekcí korelují s hladinami proteinu v játrech (Muravaki, 2001). Hladina mRNA lokalizovaná převážně v HSC (Yata, 1999) odráží stupeň fibrózy jater (Leroy, 2004). Zmíněné poznatky o expresi TIMP získané z krve a jaterních biopsií pacientů se shodují s daty z experimentálně navozeného poškození jater toxicky nebo podvazem žlučovodu. Hlavním zdrojem TIMP-1 a 2 jsou aktivované HSC. Neaktivované HSC izolované ze zdravých jater mají velmi nízkou hladinu mRNA pro TIMP-1, 2, při aktivaci kultur na plastiku se exprese několikanásobně zvýší. Při akutním poškození jater k produkci TIMP-1 přispívají také Kupfferovy buňky (Iredale, 1997). Hladina mRNA pro TIMP roste v prvních dnech po toxickém poškození jater a přetrvává několik týdnů až do rozvoje fibrózy (Iredale, 1996).

Enzym		Substráty	
Kolagenasy			
Kolagenasa 1	MMP-1	Kolageny I, II, III, VII, VIII, X, XI, želatina, glykoproteiny,	proMMP-1,2, proTNF α , API, A2M
Kolagenasa 2	MMP-8	Kolageny I, II, III, želatina,	proMMP-8, proTNF α , API, A2M
Kolagenasa 3	MMP-13	Kolageny I, II, III, VI, IX, X, želatina,	proMMP-9, 13, proTNF α , A2M
Želatinasy			
Želatinasa A	MMP-2	Kolageny I, III, IV, V, VII, X, XI glykoproteiny, elastin	proMMP-1, 2, 13, proTNF α , API, A2M, PLG
Želatinasa B	MMP-9	Kolageny IV, V, glykoproteiny, elastin	proMMP-2, 9, 13, proTNF
Stromelysiny			
Stromelysin 1	MMP-3	Kolageny III, IV, V, VII, IX, X, XI, glykoproteiny, elastin	proMMP-1, 3, 7, 8, 9, 13, proTNF α , API, A2M, PLG
Stromelysin 2	MMP-10	Kolageny III, IV, V, elastin	proMMP-1, 8, 10
Stromelysin 3	MMP-11		API, A2M
Matrilysiny			
Matrilysin 1	MMP-7	Kolageny I, IV, elastin, glykoproteiny	proMMP-1, 2, 7, 9, Fas ligand, proTNF α , API, A2M
Matrilysin 2	MMP-26	Kolagen IV, fibronektin, želatina,	proMMP-9, API, A2M
Membránové MMP			
MT1-MMP	MMP-14	Kolageny I, II, III,	proMMP-2, 8, 13, proMT1-MMP, proTNF α , API
MT2-MMP	MMP-15		proMMP-2, 13, proTNF α
MT3-MMP	MMP-16	Kolageny III, fibronektin,	proMMP-2, 13, proTNF α
MT5-MMP	MMP-24		proMMP-2, 13
MT4-MMP	MMP-17		proMMP-2, proTNF α
MT6-MMP	MMP-25		proMMP-2, 9, API
Další MMP			
Metaloelastasa	MMP-12	Elastin	API, A2M, proTNF α , PLG
Enamelysin	MMP-20	Amelogenin	
	MMP-27	Želatina, kasein	

Tabulka č. 3: Přehled MMP a jejich substrátů. (Upraveno kráceno podle Sternlicht, 2001 a Folgueras, 2004).

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Laboratorní potkani

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

Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab, Praha), o hmotnosti 450 – 550 g. První skupinu tvořili kontrolní samci, druhé pokusné skupině bylo podáváno intragastricky 17 dávek tetrachlormethanu (1ml/kg, zředěný olivovým olejem 1:1) pro navození jaterní cirhózy. Játra byla perfundována třetí den po poslední dávce tetrachlormethanu.

4.2. Perfuze jater a izolace buněčné frakce obsahující HSC

HSC byly izolovány podle postupu, který je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2005). Do portální vény byla zavedena kanyla. Játra byla perfundována postupně Hanksovým roztokem bez vápníku, 0,2% roztokem pronasy (Roche) a 0,01% roztokem kolagenasy (Roche) v kompletním Hankově roztoku (HBSS). Roztoky byly temperovány na 37 °C. Perfuze byla ukončena, jakmile bylo zřejmé, že struktura jater byla rozrušena. Buněčná suspenze byla inkubována s 0,001% roztokem DNasy (Roche) a potom centrifugována s využitím centrifugačního media Optiprep (Axis-Shield, Oslo). Ve zkumavce jsme navrstvili nejdříve buněčnou suspenzi obsahující 17% Optiprep, následně vrstvu 11,5% Optiprepu v HBSS a vše nakonec převrstvili HBSS. Buňky migrují při centrifugaci ze spodní vrstvy do střední vrstvy a posléze se shromažďují na rozhraní střední vrstvy se samotným HBSS (Graham, 2002).

4.3. Kultivace hvězdicových buněk a myofibroblastů

Čistota izolovaných HSC byla posuzována na základě fluorescence vitamínu A při 325 nm, což umožňuje vysoký obsah retinoidů v HSC (Kinnman, 2000). Buňky byly kultivovány v médiu (DMEM) s přidavkem 10% hovězího fetálního séra po dobu 2 a 7 dnů. MF byly získány opakovanou pasáží primární kultury (Kinnman, 2000). Vedle běžného způsobu kultivace na polystyrenových Petriho miskách byly buňky kultivovány v gelu připraveném buď z kolagenu typu I nebo polymerací fibrinu (Sigma).

4.4. Příprava polymerů pro kultivaci buněk

Příprava kolagenního gelu

Kolagen typu I byl extrahován z ocasních šlach potkanů 0,25 M kyselinou octovou při 4 °C, dialyzován proti 0,02 M kyselině octové, naředěn na koncentraci 1,33 mg/ml, sterilizován filtrací a použit okamžitě nebo skladován při -70 °C. Tento postup je úpravou původní metody Elsdala a Barda (1972). Zásobní roztok kolagenu typu I v kyselině octové byl smíchán se DMEM v takovém poměru, aby výsledná koncentrace kolagenu byla 0,1%. Dva ml roztoku byly ihned pipetovány do Petriho misek o ploše 8 cm² a ponechány 1 - 2 hodiny polymerovat. Gel byl překryt médiem. Následující den byla na gel napipetována suspence buněk. Adherující buňky byly pak překryty 0,4 ml kolagenu.

Příprava fibrinového gelu

Roztok fibrinogenu byl připraven rozpuštěním substance v PBS o pH 7,41 a napipetován do Petriho misky o ploše 8 cm². Thrombin byl přidán do koncentrace 0,092 U/1,4 ml gelu. Směs obsahující 1 mg fibrinogenu/ml se nechala polymerovat 1 - 2 hodiny v CO₂ inkubátoru. Poté byl gel překryt médiem. Další den bylo medium odsáto a na gel byla pipetována buněčná suspence. Buňky během noci adherovaly ke gelu. Byly překryty 0,4 ml roztoku fibrinogenu a polymerace proběhla, jak je popsáno shora.

4.5. Histologické zpracování tkáně

Jaterní tkáň byla získána před enzymatickou perfuzí jater z levého laterálního laloku, fixována 24 h formaldehydem a zalita do parafinových bločků. Histologické řezy připravovala paní laborantka Světlana Kopecká v laboratořích Neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Histologické řezy o tloušťce 5 µm se po odparafinování v xylenu a zavodnění ethanolovou řadou obarvily hematoxylinem – eozinem dále barvením dle Gömöriho, a kombinací barvení elastických vláken a Weigert - van Giesonovým barvením. Pro imunohistochemickou detekci jsme preparáty barvili pomocí specifických protilátek na α-SMA, desmin, vimentin a GFAP. K odmaskování epitopů po fixaci jsme použili vaření v citrátovém pufru o pH 6. Endogenní peroxidasa byla zablokována 3% roztokem peroxidu vodíku. Po blokování nespecifické reakce pozadí neimunním sérem jsme buňky inkubovali s primární protilátkou, výrobce a ředění jsou uvedeny v tabulce č. 4. Následovala detekce pomocí biotinylované sekundární protilátky a streptavidinu s navázanou křenovou peroxidasou (Dako) se substrátem diaminobenzidinem. Jako negativní kontrolu jsme používali bílkoviny daného živočišného druhu.

4.6. Imunocytochemie HSC a MF

Pro charakterizaci buněk jsme použili imunocytochemickou detekci vybraných bílkovin cytoskeletu - α -SMA, desmin, vimentin a GFAP (Jiroutová, 2005).

Adherentní buňky na Petriho misce jsme fixovali paraformaldehydem, permeabilizovali Tritonem X100. Další zpracování bylo analogické jako v případě histologických preparátů (kap. 3.5).

Buňky narostlé ve fibrinovém a kolagenním gelu jsme i s gelem fixovali ledovým acetonem. Specifikace primárních protilátek jsou uvedeny v tabulce č. 4. V tomto případě jsme využili fluorescenční detekci antigenů a dobarvením jader pomocí DAPI. Jako sekundární protilátku jsme použili Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG nebo FITC-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch).

Antigen	Typ	Výrobce	Ředění
αSMA	myší monoklonální	Sigma	1:400
Desmin	myší monoklonální	Dako	1:100
GFAP	myší monoklonální	Sigma	1:400
Vimentin	myší monoklonální	Dako	1:100
MMP 2	králičí polyklonální	Santa-Cruz	1:100
MMP 3	kozí polyklonální	Santa-Cruz	1:100
MMP 9	králičí polyklonální	Santa-Cruz	1:100
MMP13	králičí polyklonální	Santa-Cruz	1:100

Tabulka č. 4: Přehled použitých primárních protilátek.

4.7. Izolace RNA

Ze všech skupin buněk jsme vyextrahovali RNA fenol-chloroformovou extrakcí (Chomczynski, 1987). Buňky kultivované v gelech byly sklizeny bez použití enzymů a RNA izolována pomocí RNeasy mini kitu (Qiagen). Její čistotu jsme určili spektrofotometricky měřením při 280/260 nm a její integritu si ověřili elektroforézou na agarózovém gelu.

4.8. Inkorporace thymidinu značeného triciem do DNA dělicích se buněk

[methyl-3H] thymidin o specifické aktivitě 1.7 Tbq/mmol (Lacomed) byl přidán do média třetí den po vysazení buněk v koncentraci 37 kBq (1 μ Ci) 3H-thymidin/ml. Po 18 hodinách inkubace jsme buňky opláchli vychlazeným PBS, sklidili a nechali hydrolyzovat v 5% HClO₄ při 70 °C po dobu 30 min. V hydrolyzátu jsme stanovili množství DNA (Burton, 1956) a specifickou aktivitu automatickým spektrometrem Beckman LS6000 LL (Beckman Coulter, Inc. USA).

4.9. Microarray analýza

Postup pro návrh sond vypracovaný Ing. Rastislavem Slavkovským jsme převzali od firmy CPN. Pro návrh sond jsme použili program OligoArray 2.0. Vstupní celogenomovou databázi mRNA *Rattus norvegicus* jsme získali z webových stránek The National Center for Biotechnology Information (NCBI). Vstupní parametry pro výběr sond jsou uvedeny v tabulce č. 5. Metodika array analýzy vychází z postupu doporučeného výrobcem (Bioscience, Jena). RNA se v reakci s náhodnými primery, která je katalyzovaná reverzní transkriptasou MuMLV (Fermentas), převede na cDNA. Do reakce se kromě 4 deoxyribonukleotidů přidá deoxyuridintrifosfát s navázaným biotinem (Fermentas). Vzniklá cDNA se pak hybridizuje s čipy, které obsahují sondy (úseky DNA o délce kolem 50 basí) pro jednotlivé geny.

délka sondy	48-52 bp
procentuální obsah GC párů	30-70 %
teplota tání próby	86 – 90 °C
teplota tání sekundárních struktur próby - limit pro odmítnutí	65 °C
max vzdálenost nasednutí próby od 3' konce	4000-10000 bp
minimální vzdálenost mezi navrnutými sondami	50 bp
zakázané sekvence	AAAAA,TTTTT,CCCCC,GGGGG

Tabulka č. 5: Vstupní parametry pro výběr sond.

Po zablokování nespecifických vazebných míst kaseinem (Pierce) se na biotinové zbytky naváže konjugát streptavidinu s peroxidasou (Pierce). Jako substrát pro peroxidasu se používá barvivo True Blue (KPL). Obraz nahybridizovaného čipu jsme přes čtečku (AT reader 3, Clondiag) snímali do počítače, zpracování dat proběhlo pomocí programu Iconoclust (Clondiag). Výsledky exprese genů jsme normalizovali vztahem na všechny geny v souboru (Jiang, 2004). Průměr jejich exprese jsme položili roven 1.

4.10. Reverzní transkripce a real-time RT- PCR

Změny v expresi vybraných genů jsme si ověřili pomocí real time RT-PCR analýzy. Pro reverzní transkripci celkové buněčné RNA jsme použili High-Capacity cDNA Archive Kit s náhodnými primery. Pro stanovení relativního množství cDNA jsme použili TaqMan Universal PCR Master Mix. Sondy a primery obsažené v Taqman gene expression assay byly navrženy firmou Applied Biosystems, jejich specifikace je uvedena v tabulce č. 7. Při stanovení jsme postupovali podle pokynů výrobce. Normalizaci výsledků pro specifické geny jsme provedli vztahem na 18s RNA.

Název	Zkratka	Referenční číslo
Buněčné markery		
Desmin	Des	NM 022531
Fibulin 2	Fbln-2	XM 232197
Fibulin 5	Fbln-5	NM 019153
Kyselý gliový fibrilární protein	GFAP	NM 017009
Reelin	Rln	NM 080394
Cytokiny a růstové faktory		
Endotelin -1	Edn1	NM 012548
Faktor nádorové nekrózy α	TNF α	NM 012675
IGF vazebný protein - 5	Igfbp5	NM 012817
Interleukin -1b	IL-1b	NM 031512
Interleukin - 4	IL-4	NM 201270
Interleukin - 6	IL-6	NM 012589
Interleukin -10	IL-10	NM 012854
Interleukin -12b	IL-12b	NM 022611
Inzulínu podobný růstový faktor-1	Igf1	NM 178866
Kostní morfogenetický protein	Bmp4	NM 012827
Neurotrofin-3	NT-3	NM 031073
Relaxin	Rln1	NM 013413
Růstový faktor destiček α	PDGF α	NM 012801
Růstový faktor destiček β	PDGF β	XM 343293
Růstový faktor fibroblastů-2	FGF2	NM 019305
Růstový faktor pojivové tkáně	CTGF	NM 022266
Transformující růstový faktor β 1	Tgf β 1	NM 021578
Transformující růstový faktor β 2	Tgf β 2	NM 031131
Transformující růstový faktor β 3	TGF β 3	NM 013174
Vaskulární endotelový růstový faktor	VEGF	NM 031836
Metaloproteinasy a jejich inhibitory		
Metaloproteinasa 2	Mmp-2	NM 031054
Metaloproteinasa 3	Mmp-3	NM 133523
Metaloproteinasa 7	Mmp-7	NM 012864
Metaloproteinasa 9	Mmp-9	NM 031055
Metaloproteinasa 13	Mmp-13	XM 343345
Metaloproteinasa 12	Mmp-12	NM 053963
Metaloproteinasa 14	Mmp-14	NM 031056
α 2 Makroglobulin	A2m	NM 012488
Inhibitor aktivátoru plasminogenu	PAI-1	NM 012620
Serinová proteasa vasaící manan	p100	NM 022257
Tkáňový inhibitor MMP1	TIMP1	NM 053819
Tkáňový inhibitor MMP2	TIMP2	NM 021989
Tkáňový inhibitor MMP3	TIMP3	NM 012886

Název	Zkratka	Referenční číslo
Proteiny ECM		
Elastin	Eln	XM 341061
Fibrilin 1	Fbn1	NM 031825
Fibronektin	Fn1	NM 019143
Laminin b1	Lamb1	XM 216679
Laminin c1	Lamc1	XM 341133
Galektin1	Lgals1	NM 019904
Galektin 3	Lgals3	NM 031832
Osteonektin	SPARC	NM 012656
Osteopontin	Opn	NM 012881
Prokolagen typ I α 2	Col1a2	NM 053356
Prokolagen typ III α 1	Col3a1	XM 343563
Prokolagen typ IV α 1	Col4	XM 343607
Prokolagen typ V α 1	Col5	NM 134452
Procollagen typ XVIII α 1	Col18	XM 241632
Reelin	Reln	NM 080394
Trombospondin 1	Tsp-1	AF309630
Trombospondin 2	Tsp-2	XM 214778
Vitronektin	Vtn	NM 019156
Proteoglykany		
Agrekan	Agc1	NM 022190
Betaglykan	Beg	NM 017256
Biglycan	Bgn	NM 017087
Dekorin	Dcn	NM 024129
Lumican	Lum	NM 031050
Syndecan1	Sdc1	NM 013026
Syndecan3	Sdc3	NM 053893
Syndecan4	Sdc4	NM 012649
Perlecan	Plc	XM 233606
Provozní geny		
Aktin beta	Actb	NM 031144
GADP	GAPDH	NM 017008
18S RNA	18S RNA	X01117
Receptory		
Integrin α 5	Itga5	XM 235707
Integrin α 6	Itga6	XM 215984
Integrin α 8	Itga8	XM 344634
Integrin beta 1	Itgb1	NM 017022
Integrin beta 3	Itgb3	NM 153720
Laminin receptor	Lamr1	NM 017138
Mezibuněčná adhezni molekula	ICAM-1	NM 012967
Adhezni molekula nervových buněk	N-CAM	NM 031521
VLDL receptor	VLDLr	NM 013155

Tabulka č. 6: Přehled stanovovaných genů, jejich zkratky a referenční čísla dle NCBI.

Gen	Katalogové číslo
18S RNA	Hs03003631_g1
Catenin beta 1	Rn00670330_m1
Ctgf	Rn00573960_g1
Early growth response	Rn00561138_m1
Lumikan	Rn00579127_m1
MMP-13	Rn01448194_m1
MMP-14	Rn00579172_m1
MMP-2	Rn02532334_s1
MMP-3	Rn00591740_m1
MMP-7	Rn00563467_m1
MMP-9	Rn00579162_m1
Osteopontin	Rn00563571_m1
Pai-1	Rn00561717_m1
Prokolagen (I)	Rn00584426_m1
Prokolagen (IV)	Rn01482925_m1
Prokolagen (XII)	Rn01521249_m1
TGF- β 1	Rn00572010_m1
TGF- β 2	Rn00676060_m1
TGF- β 3	Rn00565937_m1
TIMP1	Rn00587558_m1
TIMP-2	Rn00573232_m1
Trombospondin 2	Rn01513690_m1

Tabulka č. 7: Katalogová čísla Taqman gene expression assay firmy Applied Biosystems.

4.11. Měření úbytku hmoty gelů

MF byly vysazeny na zvážené Petriho misky o průměru 35 mm do fibrinového a kolagenního gelu. Kontrolní misky byly inkubovány bez buněk. Po sedmi dnech jsme odsáli médium, misky opláchli, vysušili při 80 °C a zvážili.

4.12. Statistická analýza

Výsledky byly vyhodnoceny v programu NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical Systems, USA). Použité testy jsou uvedeny ve výsledkové části. Statistickou analýzu provedla RNDr. Eva Čermáková z Oddělení výpočetní techniky LFHK.

4.13. Přístrojové vybavení

Laboratorní potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty. Buňky byly izolovány a kultivovány na Ústavu lékařské biochemie. Zařízení pro analýzu arrayí nám zpočátku bezplatně poskytla firma CPN, Dolní Dobruč, nyní již máme vybavení na Ústavu lékařské biochemie. V případě metody rtRT-PCR měření probíhalo na Ústavu klinické biochemie Fakultní nemocnice v Hradci Králové a posléze na Ústavu farmakologie LFHK.

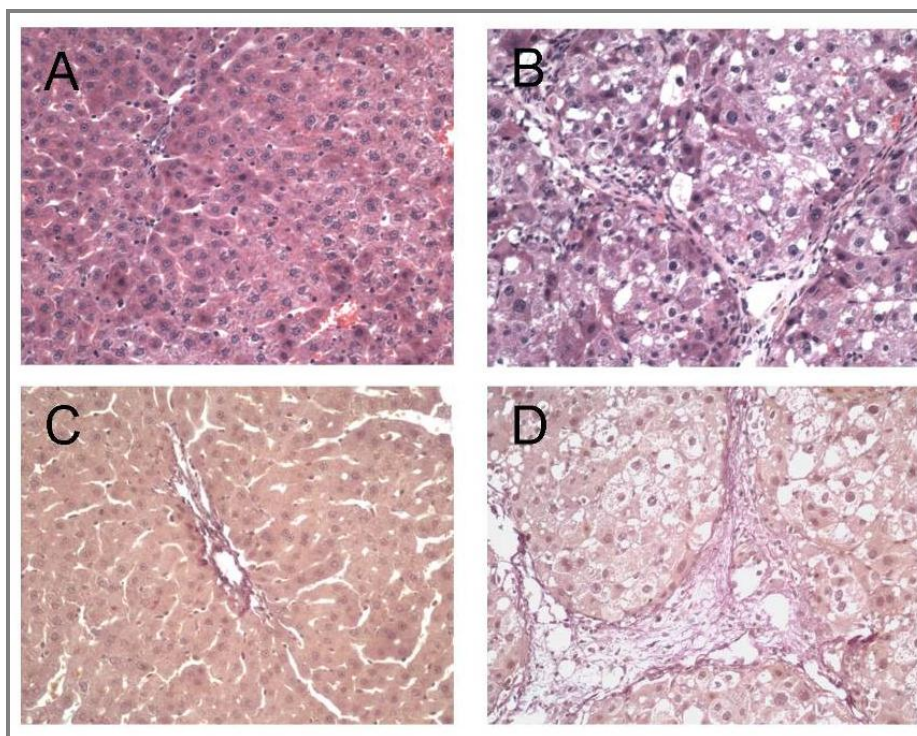
5. VÝSLEDKY

Před zahájením perfúze jater jsme si povšimli viditelných rozdílů v morfologii jater z kontrolních zvířat a těch, kteří byli vystaveni osmnácti dávkám tetrachlormethanu. U intoxikovaných zvířat se vyvinula pokročilá jaterní cirhóza, játra byla zvětšená, na pohled žlutší, na pohmat tvrdší.

5.1. Histologie a imunohistochemie normálních a cirhotických jater

Před perfuzí jater jsme odebrali jeden z laloků pro histologickou analýzu. Řezy jsme obarvili standardními histologickými barvenými, pomocí hematoxylinu – eosinu a kombinací van Giesonova barvení s barvením na elastická vlákna. Dále jsme pomocí imunohistochemických barvení α aktinu z hladkého svalu (α -SMA), desminu, kyselého gliálního fibrilárního proteinu (GFAP) a vimentinu zviditelnili neparenchymové jaterní buňky – jaterní hvězdicové buňky a myofibroblasty.

Na obrázku č. 6 vidíme srovnání normální jaterní tkáně (A, C) a cirhotické tkáně (B, D). Ve zdravých játrech je parenchym neporušený. Po obarvení hematoxylinem (A) - eosinem jsou jádra hepatocytů obarvena modře. Na obrázku vidíme jaterní lalůček s v. centralis, portobiliárními prostory a sinusoidami procházejícími mezi hepatocyty. Kolagenní vlákna se barví van Giesonovým barvením třešňově červeně, ve zdravých játrech jsme je našli v malém množství v okolí portobiliárního prostoru (C). V histologickém obrazu cirhotických jater (B)



Obrázek č. 6: Histologický preparát normálních potkaních jater (A,C) srovnání s cirhotickými játry. Barvení hematoxylin-eosin (A, B), van Gieson (C, D). Zvětšení 100x.

je patrná steatózu hepatocytu a nodulární přestavba jaterní tkáně s typickými regeneračními uzly obklopenými vazivovými septy. Kulaté prázdné prostory v hepatocytech jsou pozůstatkem po tukových kapkách, které vymizely při zpracování histologických řezů. Difúzní uzlovitá přestavba jaterní tkáně vzniká v důsledku rozsáhlého zániku hepatocytů, reparativního jizvení a hyperplazie zachovaného parenchymu. Hyperplastické uzly hepatocytů mají na rozdíl od normálních jaterních acinů nepravidelný průběh, mohou obsahovat centrální žílu, portobiliární prostor nebo žádnou z těchto struktur. Uzly jsou vzájemně odděleny různě silnými vazivovými septy obarvenými třešňově červeně (D), ve kterých jsou četné krevní kapiláry, pakanálky a různě hojný kulatobuněčný infiltrát.

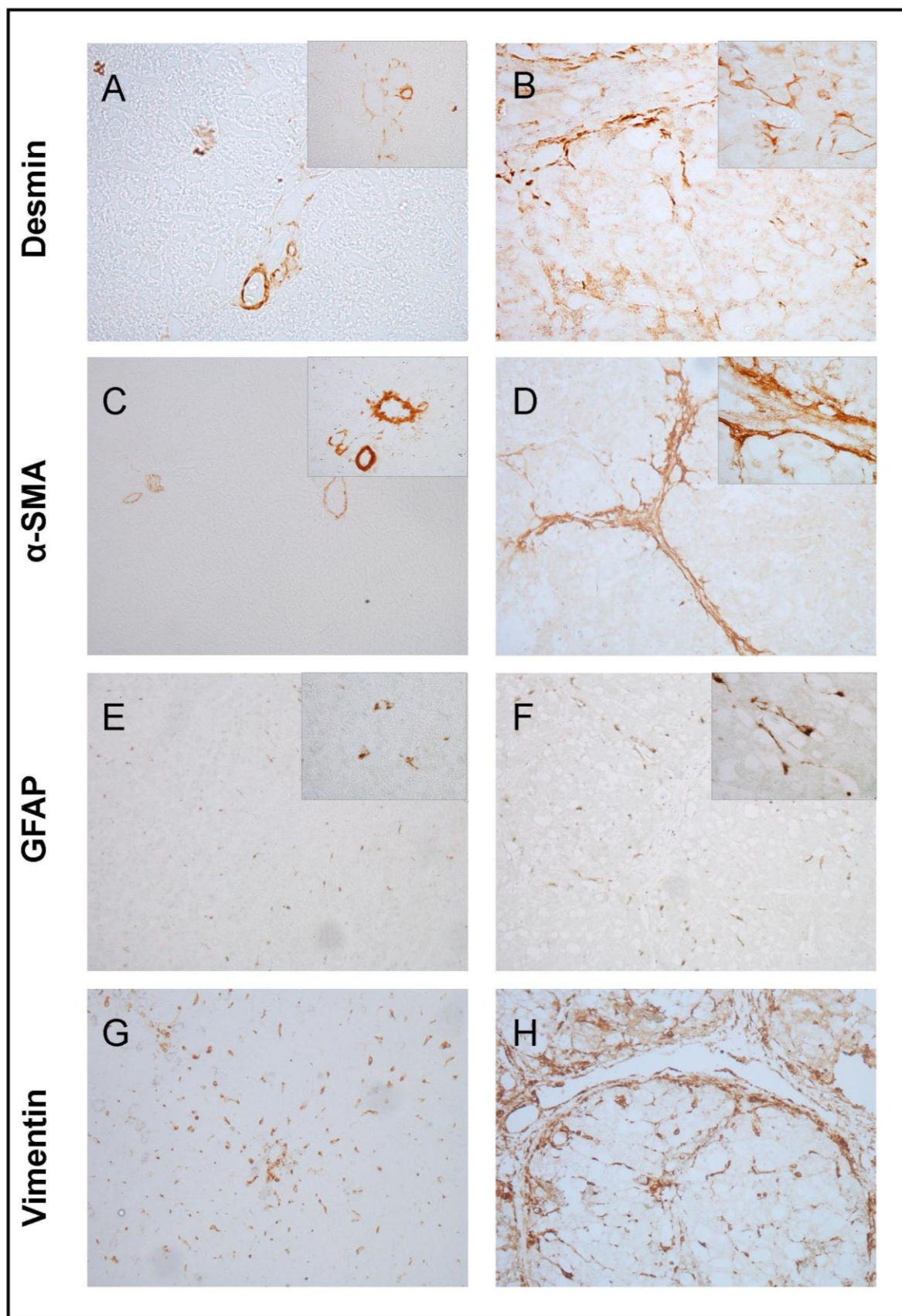
Imunohistochemie

Pomocí imunohistochemie jsme zjišťovali lokalizaci klidových jaterních hvězdicových buněk a portálních myofibroblastů ve zdravých játrech a porovnávali výsledky se situací v játrech cirhotických, která obsahují aktivované HSC a portální a septální MF. Pro průkaz HSC a MF jsme vybrali 4 markery těchto buněk: desmin, α -SMA, GFAP a vimentin (viz Tabulka č. 8 a Obr. č. 7).

Normální játra se barví pomocí protilátky proti α -SMA pouze v oblasti portobiliárního prostoru - v cévách a v přilehlých buňkách. Jedná se zřejmě o α -SMA pozitivní, desmin pozitivní a GFAP negativní pMF. Klidové HSC α -SMA neexprimují. Výskyt desmin pozitivních buněk (pMF) jsme kromě portobiliárního prostoru zaznamenali výjimečně i v parenchymu v okolí sinusoid. Jedná se zřejmě o subpopulaci HSC, které se nacházejí v prostoru mezi sinusoidami a lze je prokázat ve zdravých i cirhotických játrech pomocí GFAP. Pro cirhotická játra jsou charakteristické jizvy s p,s MF pozitivními na α -SMA, desmin a vimentin. Vimentin pozitivní buňky jsme našli v parenchymu mezi hepatocyty i v portobiliární oblasti zdravých jater, v cirhotických játrech pak nejen v parenchymu mezi hepatocyty, ale i v jizevnaté části. Vimentin je nespecifický marker, exprimují jej HSC, HSC/MF i další typy MF současně i jiné buňky mezenchymálního původu jako jsou Kupferovy buňky a buňky endotelu.

	Normální játra		Cirhotická játra	
	HSC	pMF	HSC	p,sMF
α -SMA	-	+	+	+
DES	+/-	+	+	+
GFAP	+	-	+	-
VIM	+	+	+	+

Tabulka č. 8: Výsledky imunohistochemie. Průkaz HSC a MF pomocí barvení na desmin, α -SMA, GFAP a vimentin ve zdravých a cirhotických játrech .



Obrázek č. 7: Imunohistochemický průkaz markerů HSC a MF ve zdravých játrech (A, C, E, G) a játrech cirhotických (B, D, F, H). Desmin (A, B) zvětšení 600x, ve výřezu 1000x, α -SMA (C, D), GFAP (E, F), vimentin (G,H), zvětšení 200x, ve výřezu 1000x.

5.2. Charakterizace HSC a MF pomocí vybraných cytoskeletálních markerů in vitro

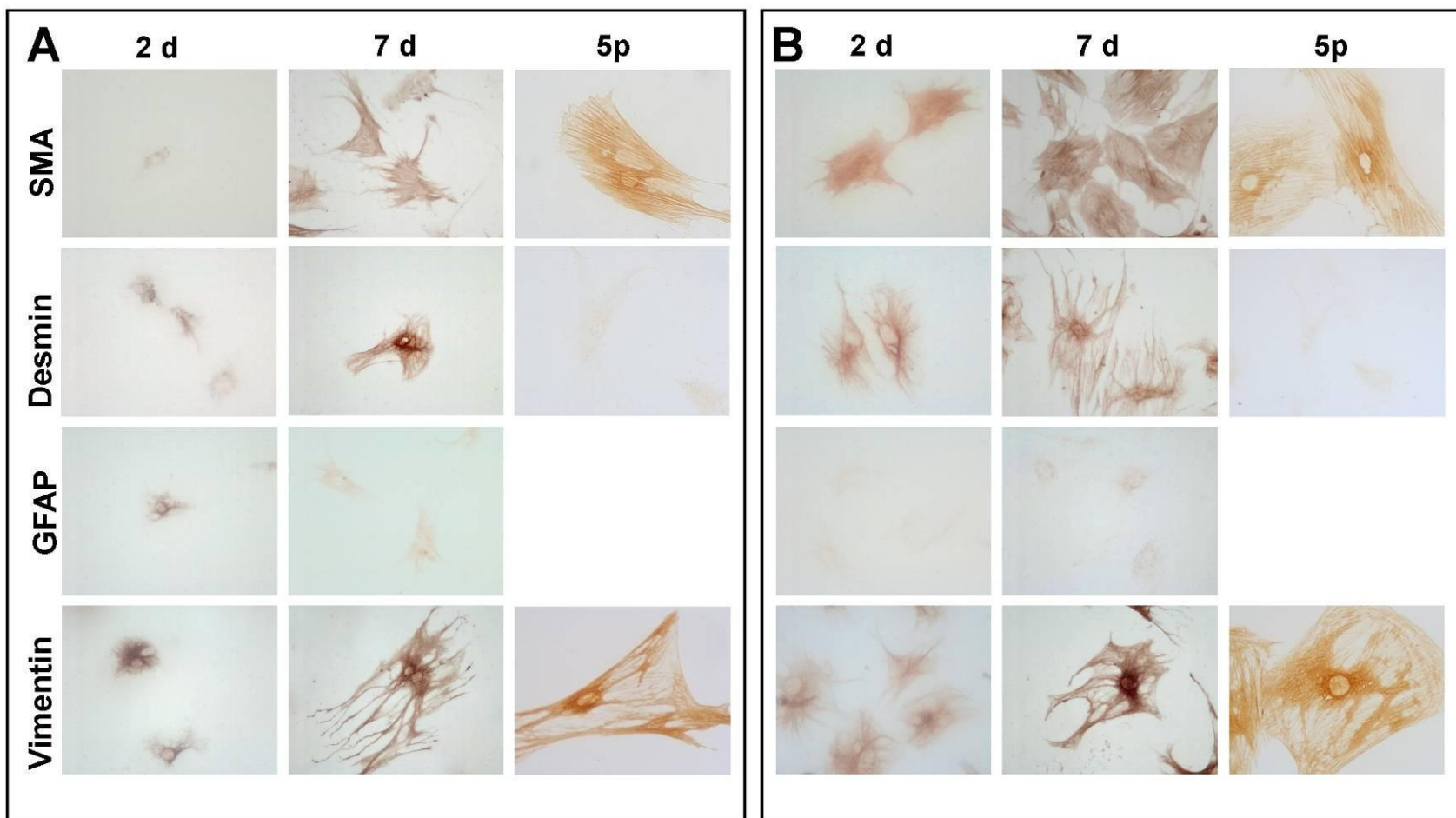
Stejně cytoskeletální markery, které jsme prokazovali v jaterní tkáni, jsme detekovali i v buněčné kultuře HSC získané ze zdravých a z cirhotických jater. V průběhu kultivace a pasážování buněk dochází ke změnám fenotypu intermediárních filament, proto jsme zvolili dva intervaly v primární kultuře a to 2 dny a 7 dní od izolace. Jaterních myofibroblasty jsme získali opakovanou pasáží neparenchymové buněčné frakce bohaté na HSC. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 9 a na obrázku č. 8.

Buňky izolované z normálních jater kultivované 2 dny se dají považovat za klidové, neaktivované HSC bez schopnosti kontrakce, exprese α -SMA zcela chybí. Naproti tomu u dvoudenních buněk z cirhotických jater je 80 % buněk pozitivních z důvodu aktivace HSC při fibrogenním procesu in vivo. Po aktivaci in vitro během sedmi dnů kultivace dosáhne pozitivitu pouze 50 % buněk. S kultivací množství vláken α -SMA stoupá jak u buněk ze zdravých jater, tak u buněk z jater cirhotických. MF jsou ve 100 % pozitivní.

	Normální játra			Cirhotická játra		
	HSC 2 d	HSC 7 d	MF	HSC 2 d	HSC 7 d	MF
α-SMA	neg.	++ 50%	+++ 100%	++ 80%	+++ 100%	+++ 100%
DES	+ 50%	++ 50%	neg	++ 60%	+++ 95%	neg
GFAP	++ 95%	neg.	-	neg.	neg.	-
VIM	++ 100%	+++ 100%	+++ 100%	++ 100%	+++ 100%	+++ 100%

Tabulka č. 9: Imunohistochemický průkaz markerů HSC a MF izolovaných ze zdravých a cirhotických jater potkanů kultivovaných 2 a 7 dní po izolaci. MF byly získány opakovanou pasáží primární kultury.

Desmin se vyskytuje u buněk jak z normálních, tak i cirhotických jater, rozdíl je však v množství. V obou případech jsou vlákna desminu přítomná po dvou dnech kultivace přibližně v polovině buněk v okolí jádra, u buněk z cirhotických jater jsou však mnohem nápadnější. S kultivací exprese desminu do 7 dne stoupá, avšak po pěti pasážích není v MF detekovatelný. Porovnáme-li α -SMA nebo desmin s GFAP, zjistíme, že má opačný trend. Zatímco téměř všechny HSC z normálních jater po dvoudenní kultivaci GFAP obsahují, aktivovaným buňkám in vivo nebo in vitro zcela chybí. Vimentin se vyskytuje ve srovnatelném množství u buněk z normálních i cirhotických jater.



Obrázek 8: Imunocytochemická detekce α -SMA, desminu, GFAP a vimentinu v HSC kultivovaných 2 dny, 7 dní a MF (5p) z normálních jater (A) a cirhotických jater (B).
 Obrázek č. 8: Imunocytochemická detekce , α -SMA, desminu, GFAP a vimentinu v HSC kultivovaných 2 dny, 7 dní a MF z normálních jater (A) a cirhotických jater (B).

5.3. Expresse genů HSC a MF izolovaných z intaktních cirhotických jater potkanů

V této části experimentu jsme porovnávali expresi vybraných genů u HSC a MF získaných z normálních jater s buňkami izolovanými z cirhotických jater. Sledovali jsme také, jak se mění exprese vybraných genů v čase, a to u HSC z normálních i cirhotických jater 2 dny po vysazení na plastovou kultivační misku, po 7 dnech kultivace a u MF po pěti pasážích.

5.3.1. Oligo cDNA array

Pomocí oligo cDNA arrayí jsme sledovali expresi genů souvisejících s metabolismem pojivové tkáně. Geny jsme pro přehlednost rozřadili do několika skupin a to: proteiny ECM, proteoglykany, metaloproteinasy a jejich inhibitory, cytokiny důležité v patogenezi jaterní cirhózy, receptory složek ECM a dále potom markery HSC a MF a provozní geny.

Výsledné hodnoty exprese genů, jejichž intenzita byla vyšší než 0,2 alespoň u jednoho z intervalů, jsou uvedeny v tabulce č. 10 (str. 45-46). Pro celkový náhled na změny odehrávající se při aktivaci a kultivaci buněk je tabulka doplněna obrázkem s grafy (obr č. 9). Grafy porovnávají expresi jednotlivých genů u buněk izolovaných z normálních a cirhotických jater (N HSC, C HSC) a kultur myofibroblastů získaných opakovanou pasáží obou typů kultur (N MF, C MF). Do grafů byla vynesena normalizovaná hodnota exprese jednotlivých genů. Vpřípadě naprosté shody exprese genů by u porovnávaných skupin buněk ležely všechny body na úhlopříčce. Ty z genů, které jsou upregulované, leží nad diagonálou, downregulované pod ní, geny ležící v blízkosti diagonály mají expresní poměr blízký jedné a jejich exprese se tedy nemění. Skupiny genů jsou v grafech barevně odlišeny. Srovnávali jsme jak časový vývoj exprese HSC 2d vs HSC 7d a HSC 7d vs MF, tak i rozdíly mezi neaktivovanými buňkami a buňkami aktivovanými in vivo N HSC 2d vs C HSC 2d a oběma typy myofibroblastů N MF a C MF. Zajímavé je také porovnání buněk aktivovaných na plastiku s buňkami aktivovanými in vivo během fibrotických dějů N HSC 7d vs C HSC 2d.

V rámci statistického zhodnocení jsme provedli analýzu rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem a Kruskal-Wallisovu analýzu rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním. Testování bylo prováděno na hladině významnosti $p=0,05$.

Aktivace HSC in vivo – porovnání N HSC 2d vs C HSC 2d

Klidové HSC izolované ze zdravých jater se při porovnávání HSC aktivovaných in vivo patologických procesem velmi liší: velikostí a tvarem buněk, zásobou retinoidů, cytoskeletálními bílkovinami – především α -SMA.

Prokázali jsme zvýšení exprese prokolagenů I, III, V (expresní poměry 5,8; 5,1; 2,0) glykoproteinu osteonektinu (2,7), proteoglykanů perlekanu (2,6) a biglykanu (2,0) ale snížení syndekanu 4 (0,4). Zvýšenou syntézu složek ECM provází jejich snížená degradace pomocí MMP. S aktivací HSC došlo ke dramatickému snížení exprese MMP-3, MMP-9, MMP-13, (0,07; 0,01; 0,09), klesla také exprese MMP-12 (0,4), MMP-14 (0,5) a naopak se zvýšila exprese MMP-2 (2,0). Pro celkový přehled změn viz obr. 9 a.

Aktivace HSC in vitro na plastiku – porovnání N HSC 2d vs N HSC 7d

Klidové HSC izolované ze zdravých jater se na plastiku během sedmidenní kultivace tzv. aktivují. Při jejich porovnávání s HSC aktivovaných in vivo patologickým procesem jsme si povšimli analogických změn v expresi, které jsme popsali v předchozím odstavci.

Dochází opět zejména k dramatickému nárůstu exprese prokolagenů I, III, V (expresní poměry 5,4; 4,6; 2,9) dále pak fibronektinu (3,7) a osteonektin (2,8). Expresí integrinů se nemění, pouze N-CAM se zvyšuje (2,6). Z proteoglykanů jsme zaznamenali zvýšení u perlekanu (2,3) a biglykanu (2,1), naopak syndekanu 4 se snížil (0,5).

I v tomto případě klesla exprese MMP a to MMP-3, MMP-9 a MMP-13 (0,07; 0,05; 0,06). Expresí MMP-2 a MMP-7 se nezměnila. S aktivitou metaloproteinás jednoznačně souvisí produkce jejich inhibitorů. Expresí nespecifického inhibitoru α -2 makroglobulinu vzrostla (1,8) stejně jako exprese tkáňového inhibitoru metaloproteinás 1 (TIMP-1) (1,5). Pro celkový přehled změn viz obr. 9 b).

Porovnání aktivace HSC in vitro a in vivo

Dalo by se říci, že se proces aktivace in vivo a in vitro doprovázejí podobné změny v expresi námi sledovaných genů. Z obrázku č. 9 d, kde vidíme porovnání aktivovaných sedmidenních HSC ze zdravých jater s aktivovanými dvoudenními HSC z cirhotických jater, je patrné, že expresní poměry mnoha genů se přiblížili jedné, stále se však ukazují co do intenzity menší změny. Statisticky významné rozdíly jsou pouze u genů pro MMP-2, integrin α 5 a NCAM.

Aktivované HSC a MF – porovnání N HSC 7d vs N MF

Myofibroblasty jsou buňky pocházející zřejmě z portálních myofibroblastů, které mají narozdíl od HSC schopnost dělit se v buněčné kultuře déle než po tři pasáže. Jedním

z popsaných markerů myofibroblastů je fibulin-2 (Knittel, 1999) v našem případě zvýšený 3,7krát respektive 9,5krát při srovnání s neaktivovanými HSC.

Při srovnání aktivovaných HSC izolovaných z normálních jater s jaterními myofibroblasty jsme zjistili mnoho rozdílů v expresi genů, které do jisté míry kopírují a prohlubují změny nastartované aktivací HSC vysazením na plast. Opět nacházíme zvýšení exprese prokolagenu typu I, III (expresní poměry 1,3), fibronektinu (1,7), osteonektinu (1,4) a trombospondinu (3,5). Osteopontin se snižuje (0,2). Exprese integrinu $\alpha 5$ se zvýšila 1,5krát, integrin $\beta 3$ a N-CAM klesají expresní poměry (0,1 a 0,7).

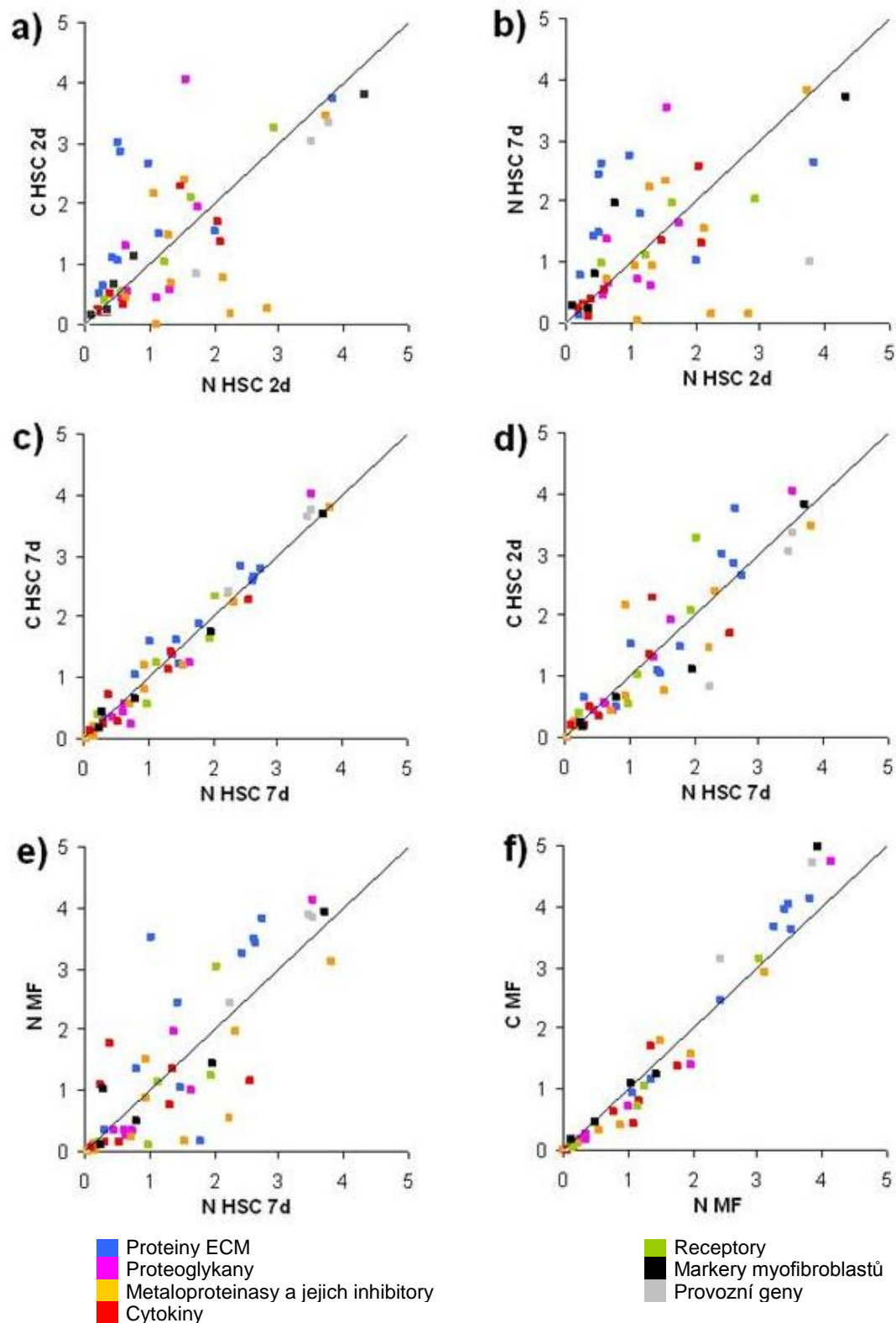
Z proteoglykanů se zvyšuje perlekan (1,2) a biglykan (1,4) naopak betaglykan a syndekan 4 se snížili (oba mají expresní poměry 0,6), statisticky významné je však v tomto případě až porovnání N MF s klidovými HSC (N HSC 2d), což by mohlo znamenat, že nejdramatičtější změny v expresi mají aktivované sedmidenní HSC již za sebou.

Zatímco exprese metaloproteinů MMP-3, 7, 9, 12, 13 u myofibroblastů je pod detekčním limitem a v porovnání s klidovými HSC došlo ke statisticky významnému snížení, u metaloproteinů 2 a 14 jsme nezaznamenali významné změny v expresi. Stejně tak inhibitory metaloproteinů TIMP-1 a 2 se nemění. Exprese α -2 makroglobulinu klesla (0,25).

Z cytokinů a růstových faktorů se mění CTGF (4,5) a PDGF (0,5), v porovnání s klidovými HSC klesá hladina profibrogenního TGF β 1 (0,4).

Porovnání aktivovaných HSC a MF z normálních a cirhotických jater

Z pokusů vyplývá, že po sedmidenní kultivaci se stírají rozdíly v expresi námi sledovaných genů (Obr. č. 9 c) mezi HSC izolovaných z normálních a cirhotických jater. Také mezi oběma populacemi MF jsme nenašli významné rozdíly (Obr. č. 9 f).



Obrázek 9: Výsledky oligo cDNA arrayů. Normalizované hodnoty exprese genů v klidových HSC (2d), aktivovaných kulturách na plastru (7d), MF z normálních jater (N MF) nebo cirhotických jater (C MF) byly vyneseny proti sobě do grafů. V případě naprosté shody exprese

	N-HSC 2d	C-HSC 2d	N-HSC 7d	C-HSC 7d	N-MF	C-MF
Proteiny ECM						
Elastin	0.28	0.65	0.31	0.32	0.35	0.26
XM-341061	0.07	0.12	0.16	0.08	0.09	0.07
Fibrilin-1	3.82	3.75	2.64	2.66^g	3.43	3.95^f
NM-031825	0.72	0.35	0.16	0.10	0.35	0.81
Fibronektin	0.44	1.10	1.43^b	1.61	2.44^{c,d}	2.46^{e,f}
NM-019143	0.10	0.21	0.25	0.34	0.26	0.31
Osteopontin	1.15	1.49	1.78	1.87	0.18^{c,d}	0.14^{e,f}
NM-012881	0.31	0.33	0.49	0.41	0.11	0.03
Prokolagen (I) α2	0.52	3.01^a	2.45^b	2.83	3.25^{c,d}	3.67^f
NM-053356	0.17	0.17	0.38	0.15	0.19	0.40
Prokolagen (III) α1	0.56	2.87	2.62	2.60	3.49^c	4.04^{e,f}
XM-343563	0.09	0.28	0.47	0.17	0.16	0.12
Prokolagen (IV) α1	0.20	0.22	0.14	0.12	0.10	0.05
XM-343607	0.04	0.07	0.06	0.06	0.02	0.02
Prokolagen (V) α1	0.52	1.05^a	1.48^b	1.22	1.06^c	0.93
NM-134452	0.04	0.11	0.25	0.16	0.16	0.22
Osteonektin	0.98	2.67^a	2.75^b	2.79	3.82^{c,d}	4.14^{e,f}
NM-012656	0.18	0.18	0.35	0.23	0.26	0.13
Trombospondin-1	2.02	1.54	1.02	1.60	3.53^d	3.62^{e,f}
AF309630	0.22	0.16	0.32	0.48	0.08	0.21
Trombospondin-2	0.22	0.50	0.79	1.04^g	1.36	1.15
XM-214778	0.04	0.11	0.27	0.32	0.71	0.53
Vitronektin	0.65	0.55	0.65	0.56	0.27^{c,d}	0.17^{e,f}
NM-019156	0.12	0.15	0.14	0.15	0.05	0.05
Proteoglykany						
Betaglykan	1.74	1.93	1.64	1.26^{g,h}	1.00^{c,d}	0.72^{e,f}
NM-017256	0.21	0.08	0.09	0.12	0.11	0.09
Biglykan	0.65	1.31	1.37	1.38	1.96^c	1.41
NM-017087	0.05	0.18	0.38	0.39	0.34	0.30
Perlekan	1.55	4.05^a	3.53^b	4.03	4.14^c	4.74
XM-233606	0.27	0.38	0.68	0.90	0.35	0.58
Syndekan-1	0.57	0.43	0.46	0.35	0.34	0.26
NM-013026	0.06	0.06	0.09	0.10	0.06	0.08
Syndekan-3	1.10	0.43	0.73	0.25	0.34	0.17
NM-053893	0.44	0.17	0.29	0.12	0.11	0.03
Syndekan-4	1.32	0.57^a	0.62^b	0.43	0.35^c	0.25
NM-012649	0.23	0.17	0.16	0.11	0.12	0.15
Metaloproteinasy						
MMP-2	1.07	2.16^a	0.95	1.20^g	1.50	1.79
NM-031054	0.05	0.14	0.20	0.29	0.40	0.19
MMP-3	2.26	0.18	0.16	0.05	0.02^c	0.01
NM-133523	0.50	0.04	0.07	0.05	0.02	0.01
MMP-7	0.64	0.44	0.71	0.56	0.23^c	0.11^f
NM-012864	0.16	0.08	0.16	0.07	0.10	0.04
MMP-9	1.11	0.00^a	0.05	0.01	0.01^c	0.00
NM-031055	0.20	0.00	0.03	0.01	0.00	0.01
MMP-12	2.13	0.76^a	1.54	1.19	0.17^{c,d}	0.07^f
NM-053963	0.35	0.24	0.30	0.33	0.14	0.03
MMP-13	2.82	0.26	0.16^b	0.19	0.13^c	0.09
XM-343345	0.68	0.07	0.07	0.08	0.05	0.03
MMP-14 MTP-1	1.33	0.68^a	0.94	0.81	0.88	0.41
NM-031056	0.31	0.16	0.23	0.19	0.13	0.13

	N-HSC 2d	C-HSC 2d	N-HSC 7d	C-HSC 7d	N-MF	C-MF
Inhibitory metaloproteinas						
α2-makroglobulin NM-012488	1.30	1.47	2.23	2.39	0.55^d	0.32^f
	0.27	0.17	0.07	0.03	0.16	0.09
TIMP-1 NM-053819	1.53	2.40	2.33	2.22	1.97	1.57
	0.22	0.37	0.15	0.29	0.19	0.46
TIMP-2 NM-021989	3.72	3.47	3.82	3.80	3.12	2.93
	0.47	0.39	0.76	0.82	0.18	0.32
Cytokiny						
CTGF NM-022266	0.39	0.50	0.39	0.72	1.77^{cd}	1.38^e
	0.08	0.15	0.23	0.41	0.20	0.14
FGF 2 NM-019305	0.26	0.20	0.30	0.25	0.15	0.06^f
	0.05	0.05	0.04	0.11	0.04	0.02
IGF 1 NM-178866	0.60	0.34	0.54	0.28	0.15	0.05^e
	0.23	0.09	0.18	0.12	0.02	0.03
IL-10 NM-012854	0.34	0.20^a	0.11^b	0.13	0.06^c	0.01^e
	0.07	0.04	0.04	0.05	0.03	0.01
PDGF β chain XM-343293	2.05	1.70	2.57	2.28	1.16^d	0.82^f
	0.17	0.20	0.53	0.49	0.32	0.22
TGF-β1 NM-021578	2.10	1.36	1.31	1.13	0.77^c	0.63
	0.35	0.40	0.24	0.22	0.20	0.11
TGF-β3 NM-013174	0.20	0.24	0.25	0.40	1.09	0.44
	0.03	0.05	0.16	0.21	0.34	0.11
VEGF NM-031836	1.49	2.29	1.35	1.43^g	1.36	1.71
	0.13	0.06	0.28	0.35	0.15	0.53
Buněčné receptory						
Integrin α 5 XM-235707	2.93	3.27	2.03	2.34^g	3.03^d	3.16
	0.44	0.21	0.12	0.18	0.39	0.37
Integrin α 6 XM-215984	0.31	0.40	0.23	0.39	0.16	0.06^{ef}
	0.04	0.12	0.08	0.20	0.06	0.02
Integrin β 1 NM-017022	1.23	1.04	1.12	1.24	1.14	0.73
	0.19	0.15	0.21	0.34	0.25	0.13
Integrin β 3 NM-153720	0.56	0.55	0.99	0.58	0.12^d	0.05^{ef}
	0.15	0.12	0.29	0.16	0.03	0.02
Laminin receptor 1 NM-017138	1.63	2.08	1.96	1.64	1.25	1.04^e
	0.32	0.30	0.21	0.29	0.09	0.17
N-CAM NM-031521	0.76	1.12	1.96^b	1.75	1.44^{cd}	1.24^f
	0.19	0.19	0.09	0.07	0.12	0.22
Markery						
Desmin NM-022531	4.32	3.81	3.71	3.68	3.93	4.97
	0.68	0.37	0.70	0.69	0.32	0.39
Fibulin-2 XM-232197	0.11	0.17	0.28	0.45	1.04^{cd}	1.10^e
	0.00	0.03	0.10	0.12	0.18	0.25
P100 NM-022257	0.45	0.67^a	0.80	0.66	0.49^d	0.46
	0.02	0.09	0.11	0.11	0.06	0.17
Reelin NM-080394	0.35	0.24	0.25	0.18	0.12	0.17
	0.07	0.11	0.09	0.07	0.05	0.04
Provozní geny						
Aktin β NM-031144	3.77	3.35	3.53	3.77	3.85	4.72
	0.34	0.20	0.76	0.81	0.39	0.32
GAPDH NM-017008.2	1.73	0.83	2.26	2.42	2.45	3.15
	0.61	0.23	0.49	0.65	0.83	1.03
18S RNA XO1117	3.51	3.05	3.46	3.64	3.88	5.12
	0.38	0.35	0.78	0.94	0.32	0.49

Tabulka 10: Výsledky oligo cDNA arrayí. Normalizované hodnoty exprese genů v klidových HSC (2d), aktivovaných kultivací na plastu (7d), jaterních myofibroblastů z normálních jater (N MF) nebo cirhotických jater (C MF). V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné o odchyly průměru získané ze čtyř měření. Statistická významnost ($p < 0.05$): a C-HSC 2d vs. N-HSC 2d, b N-HSC 7d vs. N-HSC 2d, c N-MF vs. N-HSC 2d, d N-MF vs. N-HSC 7d, e C-MF vs. C-HSC 2d, f C-MF vs. C-HSC 7d, g C-HSC 7d vs. C-HSC 2d, h C-HSC 7d vs. N HSC 7d.

5.3.2. Validace výsledků arrayí pomocí rtRT-PCR

Array v tomto metodickém provedení je metodou semikvantitativní, detekce hybridů je založena na odečtu intenzity stupně šedi. Její výhodou je multiplexnost, umožňuje rychlou orientaci v expresi řady genů během jedné analýzy. Vyžaduje však potvrzení výsledků ještě dalším postupem, nejlépe rtRT-PCR, tedy metodou, která je citlivější a přesnější s nesrovnatelně větším dynamickým potenciálem.

Cenné výsledky získáme, pracujeme-li také s jiným designem sond specifických pro daný gen. Obě metody mají odlišné způsoby normalizace, hodnoty exprese získané rtRT-PCR jsme normalizovali na provozní gen 18s mRNA, kdežto oligo cDNA array využívala normalizace exprese genů tak, aby průměr intenzity zabarvení všech spotů, na každém čipu byl roven 1 (Jiang, 2004).

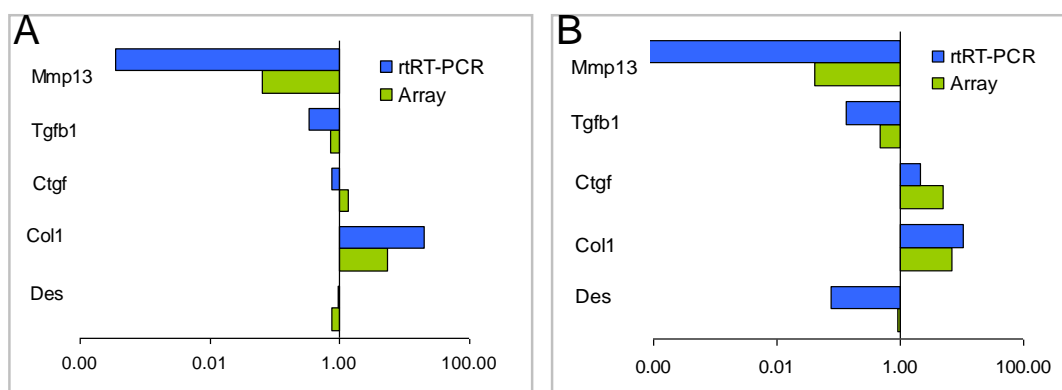
Pro validaci výsledků jsme vybrali 5 ze 49 genů z různých skupin, a to proteiny ECM, MMP, buněčné markery a cytokiny. Výsledky normalizovaných hodnot exprese genů získaných metodou rtRT-PCR jsou shrnuty v tabulce č. 11. Zaměřili jsme se na vzorky izolované pouze z normálních jater. Myofibroblasty vykazují statisticky významně sníženou expresi MMP-13, TGFβ1 a desminu v porovnání s klidovými HSC a zvýšení exprese CTGF oproti aktivovaným HSC.

V rámci statistického zhodnocení jsme provedli analýzu rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem a Kruskal-Wallisovu analýzu rozptylu s následným mnohonásobným porovnáním. Testování bylo prováděno na hladině významnosti $p=0,05$.

	N-HSC 2d	N-HSC 7d	N-MF
Prokolagen typ I	1.75 ± 0.54	35.15 ± 9.84 ^a	18.64 ± 2.5
MMP13	886.64 ± 439.54	0.42 ± 0.24	0.1 ± 0.07 ^b
TGFβ1	5.15 ± 0.54	1.77 ± 0.19 ^a	0.7 ± 0.07 ^b
CTGF	4.27 ± 1.28	3.15 ± 0.83	8.85 ± 1.21 ^c
Desmin	179.13 ± 59.63	170.04 ± 19.6	13.53 ± 8.48 ^{b,c}

Tabulka 11: Výsledky normalizovaných hodnot exprese genů získaných metodou rtRT-PCR. Statistická významnost ($p < 0.05$): a N-HSC 7d vs. N-HSC 2d, b N-MF vs. N-HSC 2d, c N-MF vs. N-HSC 7d (n=3).

Pro porovnání obou metod jsou v grafu č. 1 znázorněny expresní poměry jednotlivých genů u klidových HSC v porovnání s aktivovanými HSC (A) a u klidových HSC v porovnání s myofibroblasty (B). U všech sledovaných genů (s výjimkou Ctgf) se výsledky arrayí potvrdily.

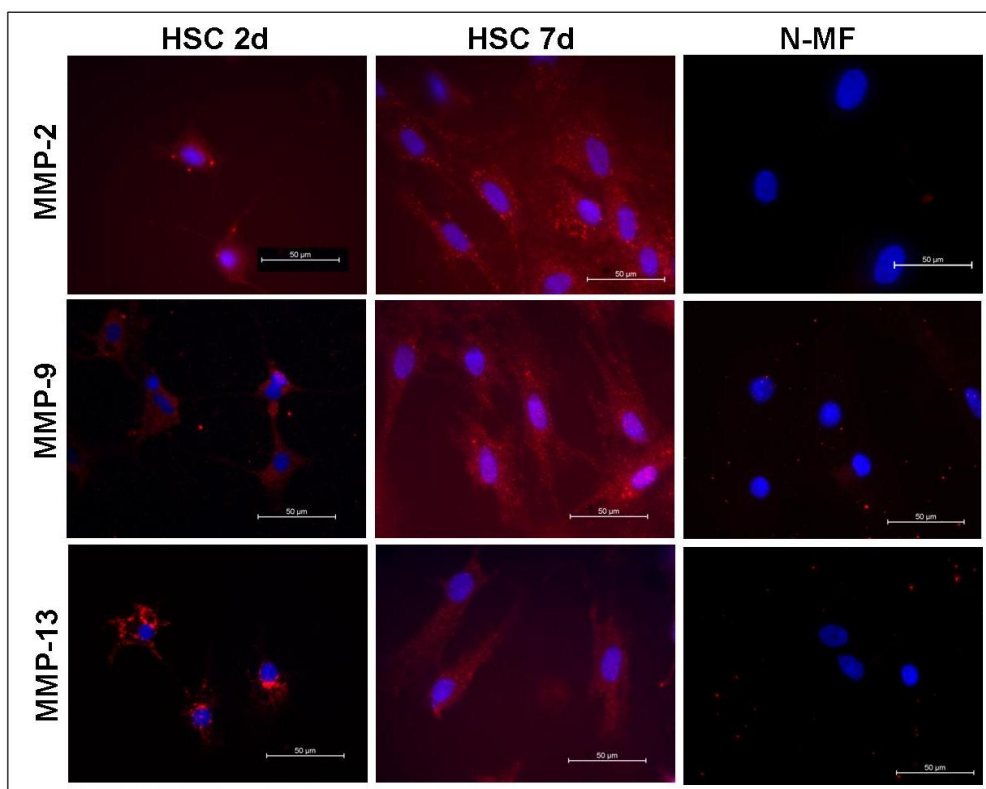


Graf č. 1: Porovnání expresních poměrů získaných z arrayí (zeleně) a rtRT-PCR (modře). Poměr exprese genů N HSC 7d/2d (A) a N MF/ N HSC 2d (B). Logaritmické vynesení.

Jak jsme předpokládali, rtRT-PCR je o několik řádů citlivější než array (viz expresní poměry MMP-13), kterou nelze v jednom experimentu postihnout změny genů o velmi vysoké či nízké relativní koncentraci. V prvním případě dojde k vysycení kapacity spotu, ve druhém je signál pro detekci příliš nízký a je vyhodnocen jako nespecifická vazba složek detekčního systému neboli pozadí. Je tedy metodou specifickou a vhodnou k celkovému náhledu na změny exprese probíhající v HSC, nevhodnou však pro kvantifikaci změn.

5.3.3. Imunocytochemická detekce MMP u HSC izolovaných z normálních jater

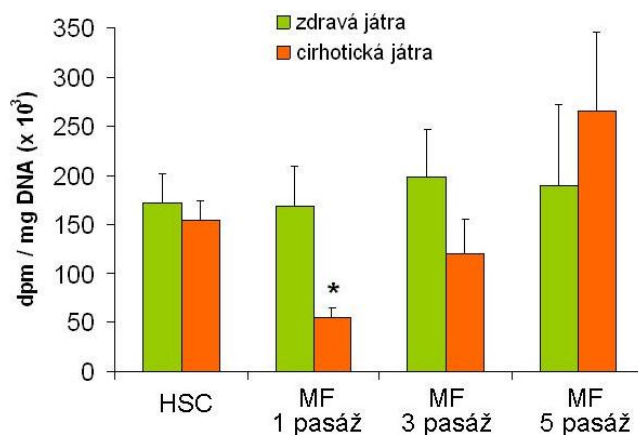
Jak ukázaly předchozí výsledky, exprese MMP-2, 9, 13 je vysoká v HSC izolovaných z normálních jater a kultivovaných 2 dny na plastu. Po aktivaci HSC exprese MMP-9 a 13 klesá a exprese MMP-2 se nemění. Pomocí imunofluorescence (Obr. č. 10) jsme detekovali pozitivitu MMP-2, 9, 13 v obou časových intervalech. Exprese proteinů MMP-9 a 13 v HSC přetrvává až do jejich aktivace, kdy hladina mRNA klesla. MF nevykazují pozitivitu pro MMP-2, 9, 13.



Obrázek č. 10: Imunofluorescence MMP-2, MMP-9, MMP-13 u HSC na plastru 2d 7d a MF.

5.3.4. Inkorporace thymidinu – dělení buněk během pasáží

Pomocí měření inkorporace radioaktivního ^3H -thymidinu do buněčné DNA jsme sledovali rozdíly v míře syntézy DNA primární kultury HSC a MF po jedné, třech a pěti pasážích. U buněk z normálních jater jsme nezjistili žádné rozdíly. Myofibroblasty z cirhotických jater po 1 pasáži vykazují sníženou syntézu DNA ve srovnání s primární kulturou HSC a s MF po páté pasáži.



Graf č. 2: Výsledky měření inkorporace značeného radioaktivního ^3H -thymidinu do buněčné DNA. Srovnání HSC a MF (1, 3, 5 pasáž) z normálních a cirhotických jater (n=4). * znamená statistickou významnost ($p < 0.05$) porovnání MF 1 pasáž s HSC a MF 1 pasáž s MF 5 pasáž u buněk izolovaných z cirhotických jater (n=4).

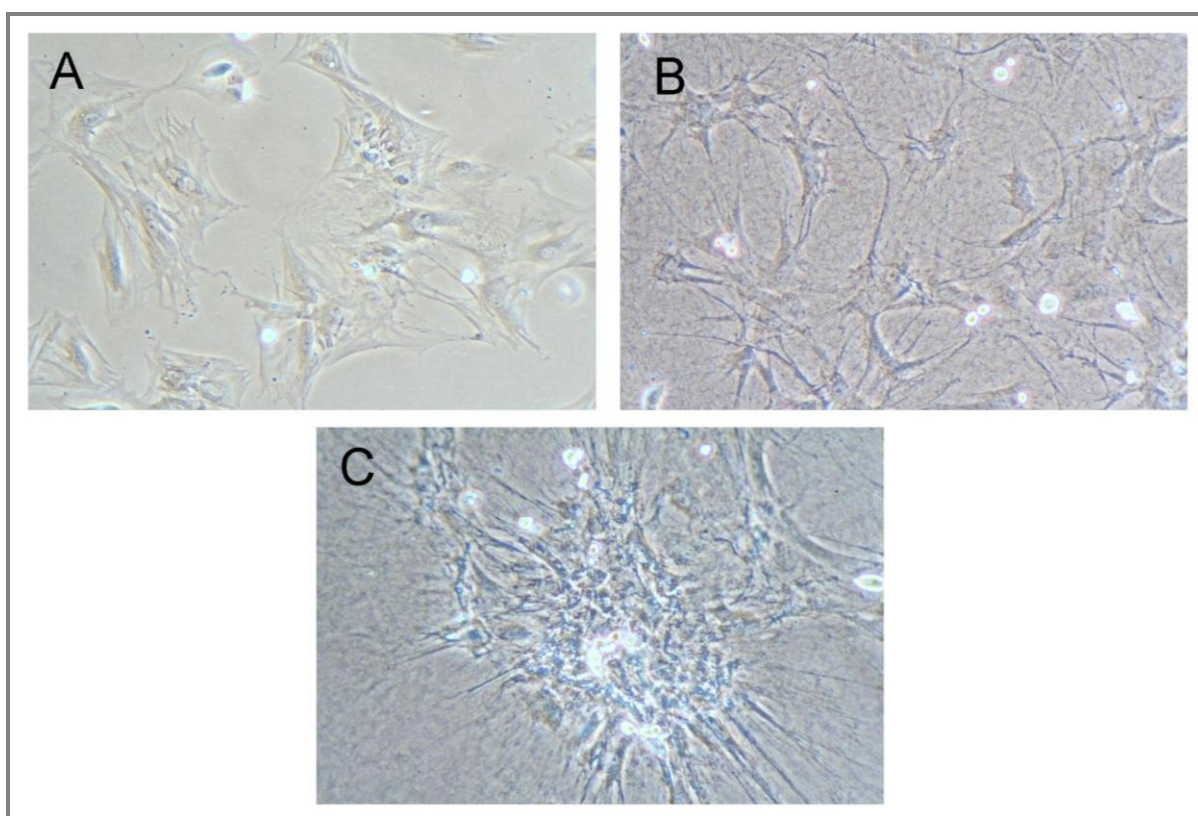
5.4. Ovlivnění MF kultivací ve fibrinovém a kolagenním gelu

Druhou ucelenou část disertační práce tvoří výzkum vlivu složek extracelulární matrix – kolagenu typu I a fibrinu na jaterní myofibroblasty, které označujeme jako MF. MF jsme získali opakovanou pasáží (5x) neparenchymové buněčné frakce bohaté na HSC, jedná se o plně aktivované kontraktilní buňky původně ze zdravých jater potkanů.

MF jsme kultivovali v kolagenním a fibrinovém gelu a sledovali jsme morfologii, růst a především expresi genů souvisejících s metabolismem právě ECM.

5.4.1. Morfologie MF v gelech

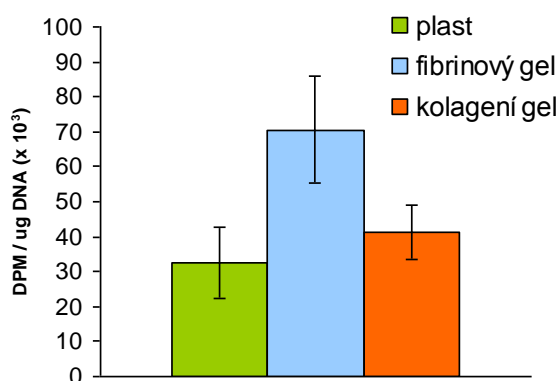
MF vysazené na plastik jsou velké buňky polygonálního tvaru s viditelnými stresovými vlákny, které jsou po imunocytochemickém barvení pozitivní α -SMA. Po vysazení do fibrinového gelu jsou pro buňky charakteristické dlouhé výběžky, v kolagenním gelu jsou výběžky buněk spíše kratší, buňky mají také tendenci shlukovat se (Obr č. 11).



Obrázek č. 11: MF na plastu (A), ve fibrinovém (B) a kolagenním gelu (C). 24 h po vysazení. Zvětšení 100x.

5.4.2. Inkorporace thymidinu do buněk ve fibrinovém a kolagenním gelu.

Pomocí měření inkorporace radioaktivního ^3H -thymidinu do buněčné DNA jsme nezjistili statisticky významné rozdíly v syntéze DNA u MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu v porovnání s plastem (Graf č. 3). Pro statistické zhodnocení byl použit dvouvýběrový t-test. Hladina významnosti byla $p=0,05$.



Graf č. 3: Výsledky měření inkorporace značeného radioaktivního ^3H -thymidinu do buněčné DNA MF kultivovaných na plastu, ve fibrinovém a kolagenním gelu ($n=4$).

5.4.3. Výsledky oligo cDNA arrayí MF ve fibrinovém a kolagenním gelu

Pomocí oligo cDNA arrayí jsme porovnávali expresi genů souvisejících s metabolismem pojivové tkáně. Geny jsme opět pro přehlednost rozřadili do několika skupin: proteiny ECM, proteoglykany, metaloproteinasy a jejich inhibitory, cytokiny důležité v patogenezi jaterní cirhózy, receptory složek ECM a dále potom markery MF a provozní geny. Výsledné hodnoty relativní exprese genů jsou uvedeny v tabulce č. 12. Exprese genů na plastiku byla hodnocena jako 100%. K dalšímu vyhodnocení byly opět zařazeny pouze geny, jejichž intenzita signálu po normalizaci byla vyšší než 0,2. Pro statistické zhodnocení byl použit jednovýběrový t-test, testovala se hypotéza shody hodnot exprese ve fibrinovém nebo kolagenním gelu se stem. Hladina významnosti byla $p=0,05$.

Fibrinový gel: Kultivace MF ve fibrinovém gelu ovlivnila expresi řady genů. Z proteoglykanů se v MF po kultivaci ve fibrinovém gelu zvýšila exprese perlekanu naopak syndekan 4 klesl. Zatímco exprese glykoproteinů osteonektinu a trombospondinu 1 se zvýšila, exprese osteopontinu naopak klesla. Exprese kolagenů I, III, IV, V a fibronektinu se nezměnila. Exprese metaloproteinasy se významně nezměnila, exprese jejich inhibitorů TIMP 1 a 2 lehce vzrostla. Ve skupině cytokinů a růstových faktorů došlo k poklesu exprese PDGF α , TNF α a zvýšení exprese BMP4.

	Fibrinový gel	Kolagenní gel		Fibrinový gel	Kolagenní gel
Proteiny ECM			Cytokiny a růstové faktory		
Prokolagen (I) α 2	113 \pm 4	109 \pm 4	BMP4	115 \pm 3 *	107 \pm 7
Prokolagen (III) α 1	115 \pm 5	106 \pm 7	CTGF	87 \pm 11	84 \pm 5
Prokolagen (IV) α 1	101 \pm 6	79 \pm 6 *	FGF2	86 \pm 17	97 \pm 4
Prokolagen (V) α 3	91 \pm 7	82 \pm 2 *	IGF1	92 \pm 22	116 \pm 31
Elastin	110 \pm 9	103 \pm 4	IGFBP5	84 \pm 20	63 \pm 8 *
Fibronektin	109 \pm 6	109 \pm 5	IL-6	97 \pm 10	135 \pm 39
Laminin b1	202 \pm 115	215 \pm 96	PDGF α	67 \pm 8 *	106 \pm 8
Laminin c1	79 \pm 17	105 \pm 23	PDGF β	101 \pm 8	115 \pm 2 *
Galektin 1	105 \pm 6	110 \pm 3 *	TGF β 1	63 \pm 12	143 \pm 19
Galektin 3	98 \pm 9	113 \pm 2 *	TGF β 2	98 \pm 2	94 \pm 3
Osteonektin	117 \pm 4 *	112 \pm 9	TGF β 3	82 \pm 8	63 \pm 5 *
Osteopontin	79 \pm 6 *	119 \pm 17	TNF α	83 \pm 3 *	79 \pm 3 *
Trombospondin 1	111 \pm 3 *	112 \pm 7	VEGF	111 \pm 5	104 \pm 6
Trombospondin 2	101 \pm 3	83 \pm 16	Receptory		
Vitronektin	97 \pm 12	104 \pm 5	Integrin α 5	116 \pm 5	110 \pm 6
Proteoglykany			Integrin α 6	102 \pm 9	83 \pm 3 *
Betaglykan	94 \pm 8	101 \pm 3	Integrin α 8	60 \pm 7 *	58 \pm 6 *
Biglykan	105 \pm 6	112 \pm 4	Integrin β 1	95 \pm 10	101 \pm 3
Perlekan	125 \pm 4 *	118 \pm 12	Integrin β 3	99 \pm 10	96 \pm 15
Syndekan 1	102 \pm 16	90 \pm 7	Laminin rec1	99 \pm 8	108 \pm 3
Syndekan 4	85 \pm 3 *	103 \pm 27	ICAM-1	82 \pm 10	82 \pm 2
Metaloproteinasy			N-CAM	106 \pm 8	102 \pm 6
MMP-2	105 \pm 9	100 \pm 5	Buněčné markery		
MMP-3	143 \pm 33	150 \pm 48	Desmin	118 \pm 6	111 \pm 6
MMP-7	121 \pm 21	91 \pm 10	Fibulin 2	92 \pm 9	90 \pm 6
MMP-12	83 \pm 13	105 \pm 6	Fibulin 5	71 \pm 11	51 \pm 5 *
MMP-13	105 \pm 17	106 \pm 4	Reelin	94 \pm 17	115 \pm 6
MMP-14	75 \pm 13	170 \pm 19*	Provozní geny		
Inhibitory metaloproteinasy			Aktin β	114 \pm 3	105 \pm 9
α 2 makroglobulin	108 \pm 5	96 \pm 7	GAPDH	103 \pm 17	95 \pm 19
PAI-1	106 \pm 6	103 \pm 6	18S RNA	117 \pm 8	104 \pm 8
TIMP1	111 \pm 2 *	106 \pm 6			
TIMP2	109 \pm 1 *	107 \pm 7			
TIMP3	73 \pm 13	85 \pm 2 *			

Tabulka č. 12: Výsledky oligo cDNA arrayů MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu. Expresí genů na plastiku byla hodnocena jako 100%. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky průměru čtyř měření. * značí statistickou významnost v porovnání s expresí na plastiku ($p < 0.05$)

Kolagenní gel: Přítomnost kolagenního gelu měla negativní vliv na expresi kolagenu IV a V, exprese integrinů $\alpha 6$ a $\alpha 8$ se také snížila. U galektinů 1 a 3 tomu bylo naopak, jejich exprese lehce vzrostla. Kolagenní gel stimuloval v MF expresi MMP 14, exprese TIMP 3 se snížila. Ve skupině cytokinů a růstových faktorů došlo ke zvýšení exprese PDGF β , TNF α , IGFBP5 a TGF $\beta 3$.

5.4.4. Validace výsledků arrayí pomocí rt RT-PCR

Pro validaci výsledků oligo cDNA arrayí a jejich zpřesnění jsme vybrali 20 genů a to proteiny, glykoproteiny, metaloproteinasy, cytokiny a transkripční faktory. Výsledky normalizovaných hodnot exprese genů získaných metodou rtRT-PCR jsou shrnuty v tabulce č. 13. Jedná se o průměry ze šesti pokusů, výsledky jsou uvedeny v procentech vztažených vždy na kontrolní buňky vysazené na plastik.

Pro statistické zhodnocení byl použit jednovýběrový t-test, testovala se hypotéza shody hodnot exprese ve fibrinovém nebo kolagenním gelu se stem. Pro porovnání skupin fibrinový a kolagenní gel byl použit dvouvýběrový t-test. Hladina významnosti byla $p=0,05$.

Při kultivaci buněk ve fibrinovém gelu se proti MF na plastiku signifikantně snížila exprese metaloproteinasy MMP-7 a MMP-9 a také jejich inhibitoru PAI-1. Snížila se exprese TGF- $\beta 2$ a osteopontinu. Kolagenní gel měl na expresi genů výraznější vliv. Došlo ke dramatickému zvýšení exprese metaloproteinasy MMP-3 a MMP-13, ovšem s vysokou směrodatnou odchylkou mezi jednotlivými pokusy. Rovněž exprese MMP-2 a MMP-14 se zvýšila.

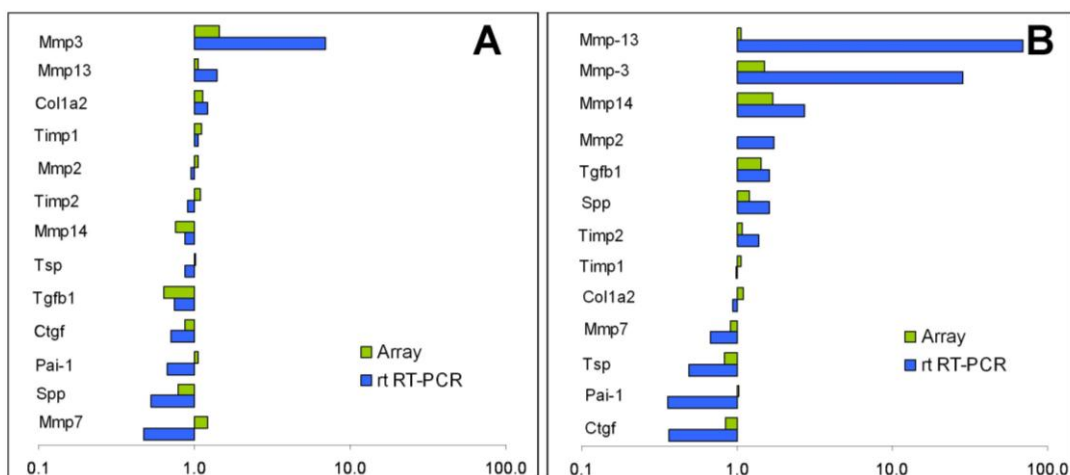
Mezi sledovanými cytokiny se zvýšila exprese TGF $\beta 1$, exprese TGF $\beta 2$, IL-6 a CTGF klesla. Z prokolagenů jsme zaznamenali změnu pouze u typu XII, a to ve smyslu snížení exprese v porovnání s MF na plastiku.

Testovali jsme také statistickou významnost rozdílů exprese MF ve fibrinovém gelu vůči MF v kolagenním gelu, abychom odpověděli na otázku, jak různé složení trojrozměrného prostředí ovlivňuje expresi genů. Fibrinová matrix nestimuluje expresi metaloproteinasy MMP-2,9,13,14 tak jako kolagenní, nepotencuje expresi osteopontinu a nesnižuje expresi trombospondinu-2 a prokolagenu typu XII.

Název genu	Fibrinový gel	Kolagenní gel
Metaloproteinasy a jejich inhibitory		
MMP-2	92 ± 21	167 ± 11 ^{a,b}
MMP-3	579 ± 271	1772 ± 1333
MMP-7	51 ± 17 ^a	87 ± 23
MMP-9	20 ± 3 ^a	162 ± 65 ^b
MMP-13	105 ± 49	4086 ± 3289
MMP-14	80 ± 12	298 ± 41 ^{a,b}
TIMP1	95 ± 10	84 ± 19
TIMP2	86 ± 17	128 ± 16
PAI-1	67 ± 10 ^a	30 ± 5 ^{a,b}
Cytokiny		
IL-6	98 ± 23	49 ± 16 ^a
TGF β1	90 ± 13	195 ± 28 ^{a,b}
TGF β2	72 ± 5	22 ± 2 ^a
TGF β3	53 ± 5 ^a	22 ± 5 ^{a,b}
CTGF	92 ± 16	40 ± 3 ^{a,b}
Proteiny a glykoproteiny		
Lumican	251±73	545±167 ^a
Prokolagen (I) α2	149 ± 35	106 ± 11
Prokolagen (IV) α1	101 ± 14	93 ± 21
Prokolagen (XII) α1	105 ± 11	54 ± 5 ^{a,b}
Trombospondin 2	97 ± 13	44 ± 6 ^{a,b}
Osteopontin	55 ± 8 ^a	217 ± 51 ^b
Trankripční faktor		
Early growth response 1	193 ± 63	150 ± 49
Marker		
Catenin β1	82 ± 24	104 ± 10

Tabulka č. 13: Výsledky oligo cDNA arrayí MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu po dobu 5 dnů. Expres genů na plastiku byla hodnocena jako 100%. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky průměru ze šesti měření. Statistická významnost: ^a značí porovnání gelů a plastiku (p<0.05), ^b porovnání fibrinového gelu vůči kolagennímu gelu (p<0.05)

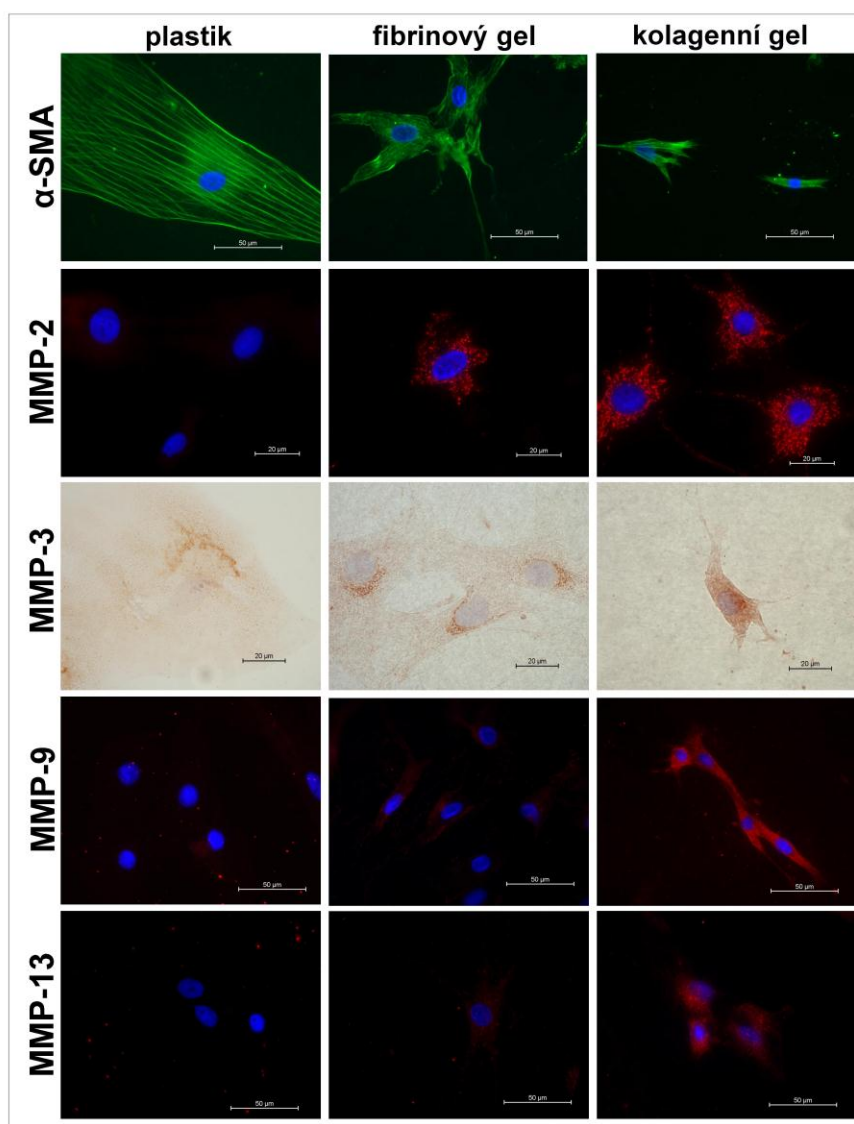
Porovnání obou metod měření exprese genů je vyneseno v grafu č. 4. Znáznorněny jsou poměry exprese jednotlivých genů MF na plastu vůči fibrinovému gelu (A) a MF na plastu vůči kolagennímu gelu (B). Porovnáme-li obě metody měření exprese genů, dospějeme ke zjištění, že poměry exprese jednotlivých genů na plastu se ve většině případů shodují ve smyslu up- nebo down-regulace. Opět se ukázala vyšší citlivost rt RT-PCR.



Graf č. 4: Porovnání poměrů exprese získaných z arrayí (zeleně) a rtRT-PCR (modře). Poměr exprese genů MF plast / fibrinový gel (A) plast / kolagenní gel (B). Logaritmické vynesení.

5.4.5. Imunocytochemický průkaz metaloproteinů MF v gelech

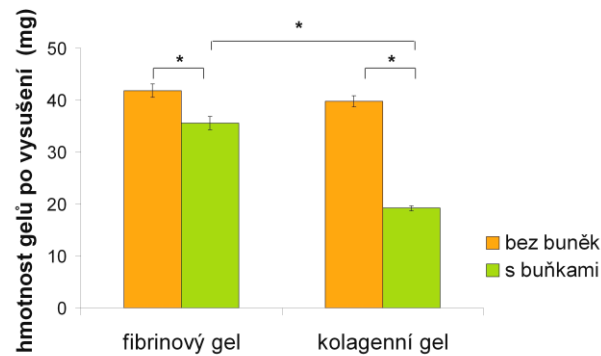
V předchozích kapitolách je zdokumentováno, jak trojrozměrné kultivační prostředí ovlivňuje expresi genů. Pro ověření výsledků na úrovni proteinů jsme vybrali imunocytochemickou detekci metaloproteinů MMP-2, 3, 9, 13 v kolagenním a fibrinovém gelu a na plastiku. Analýzu jsme doplnili o barvení na α -SMA, abychom zviditelnili tvar buněk. Buňky na plastiku nebyly pozitivní na žádnou ze zvolených metaloproteinů. U buněk ve fibrinovém gelu jsme našli pozitivitu na MMP-2 a slabou pozitivitu MMP-3. Buňky v kolagenním gelu se barvily pozitivně na všechny sledované metaloproteiny (Obr. č. 12).



Obrázek č. 12: Myofibroblasty na plastu, ve fibrinovém a kolagenním gelu. Imunofluorescence α -SMA, MMP-2, MMP-3, MMP-9 a MMP-13.

5.4.6. Měření úbytku hmoty gelů

Při kultivaci MF v gelech po dobu jednoho týdne jsme pozorovali výrazný úbytek hmoty gelu, zřejmě vlivem zvýšené exprese metaloproteinasy v buňkách. Úbytek jsme kvantifikovali zvážením sušiny zbylého gelu s buňkami. Myofibroblasty kultivované v gelu po dobu jednoho týdnu solubilizovaly 51 % hmoty kolagenního gelu, resp. 15 % fibrinového gelu (viz Graf č. 5). Pro statistické zhodnocení byl použit dvouvýběrový t-test.



Graf č. 5: Úbytek Hmotnosti gelů po sedmidenní kultivaci s MF. Průměr z 9 stanovení. Statistická významnost ($p < 0.05$).

6. DISKUSE

V první části práce jsme se zabývali změnami exprese genů HSC a MF izolovaných z normálních a cirhotických jater. Naším cílem bylo popsat aktivaci HSC in vitro a in vivo. Předcházela tomu identifikace a charakterizace izolovaných buněk pomocí známých markerů imunocytochemicky a histologický rozbor jaterní tkáně.

6.1. Imunohistochemická a imunocytochemická charakterizace HSC a MF

Jelikož bylo naším cílem sledovat změny exprese genů spojené s aktivací HSC in vivo i in vitro izolovali jsme zdravých i cirhotických jater potkanů neparenchymovou buněčnou frakci obsahující HSC. Izolace HSC s použitím hustotního gradientu je obecně přijímanou metodou (Ramadori, 2002). Neparenchymová buněčná frakce kromě klidových HSC obsahuje i MF (Ogawa, 2007). HSC se kultivací aktivují, ale jejich proliferační potenciál je omezený, udává se, že jsou schopné přežít 2 pasáže. Naopak MF lze kultivovat i po opakované pasáži (Kim, 2005). Domníváme se tedy, že na počátku námi izolovaná frakce obsahuje převážně klidové HSC – po dvou dnech od izolace. Po sedmi dnech se jedná o aktivované HSC a buněčná kultura po pěti pasážích představuje buněčnou populaci složenou z MF. Toto tvrzení jsme se snažili doložit pomocí imunocytochemického průkazu markerů jednotlivých typů buněk.

Primární kultura neparenchymových buněk obsahovala jak HSC tak MF, po pěti pasážích v kultuře převládly α -SMA pozitivní, desmin negativní MF. Jak je uvedeno v další kapitole, ověřili jsme si v MF i expresi fibulinu-2, který slouží také k odlišení MF od HSC (Knittel, 1999). Klidové HSC izolované z nepoškozených byly α -SMA negativní, s jejich aktivací exprese roste, což je v souladu s publikovanými pracemi např. Neubauer (1996). Část HSC byla desmin pozitivní, během opakovaného pasážování desmin pozitivní buňky vymizely. Desmin je bílkovina středních filament svalových buněk, jeho přítomnost v HSC ukazuje na jejich příbuznost se svalovými buňkami.

Abychom se ujistili, že byla cirhóza navozena úspěšně, odebírali jsme před perfuzí vzorek jaterní tkáně. V histologickém obrazu jsme našli steatózu hepatocytů a nodulární přestavbu jaterní tkáně. V okolí regeneračních uzlů jsme histologickým barvením prokázali zmožení kolagenních, elastických i retikulárních vláken. Pomocí imunohistochemického barvení jsme ve zdravých játrech detekovali portální MF, lokalizované v portobiliárním prostoru. pMF jsou buňky α SMA pozitivní, desmin pozitivní a GFAP negativní. Hvězdicové buňky se nacházejí

v prostoru mezi sinusoidami. Narozdíl od pMF jsou GFAP pozitivní, α SMA negativní, desmin negativní.

V cirhotických játrech se popisuje několik typů myofibroblastických buněk: portální, septální myofibroblasty a MF, vzniklé aktivací HSC (HSC/MF). MF se nacházely podél vazivových sept v dilatovaných portobiliárních prostorech i mezi sinusoidami uvnitř regeneračních uzlů. MF jsou buňky pozitivní na α -SMA a desmin. HSC/MF se liší od pMF obsahem GFAP. GFAP, navržený jako specifický marker pro HSC (Neubauer, 1996), ukazuje na jejich příbuznost s nervovými buňkami. Je obsažen ve výběžcích astrocytů (Weinstein a spol. 1991). Při kultivaci buněk GFAP exprimovaly pouze klidové HSC izolované z normálních jater. Na histologických řezech jsme našli pozitivitu na GFAP klidových i aktivovaných HSC, mohlo tedy dojít k vymizení exprese tohoto antigenu velmi záhy po jejich izolaci. Normální i cirhotická játra obsahují vimentin pozitivní buňky v parenchymu v portální oblasti i podél vazivových sept v případě jater cirhotických. Barvení na vimentin není specifické pouze pro HSC a MF.

6.2. Změny v expresi genů spojené s aktivací HSC

HSC a MF jsou označovány za hlavní producenty ECM v játrech. Aktivaci HSC a MF až už in vitro na plastiku nebo in vivo při toxickém poškození jater provází dramatické změny v genové expresi (Liu, 2004; Takahara, 2006; Jiroutová, 2007). V naší práci jsme sledovali expresi genů, které souvisí s metabolismem ECM a mohou přispívat k rozvoji jaterní fibrózy. Genovou expresi jsme sledovali v intervalech 2 a 7 dní, a to jak u HSC izolovaných z normálních jater potkanů, tak z jater s rozvinutou cirhózou po opakovaném podávání CCl₄. MF jsme vykultivovali opakovaným pasážováním primokultury z normálních i cirhotických jater. Změny v genové expresi jsme analyzovali s pomocí oligo cDNA araiy.

Máme-li zjednodušeně charakterizovat naše výsledky, tak mezi klidovými a aktivovanými HSC a HSC a MF jsme zaznamenali řadu rozdílů v expresi genů, zatímco mezi MF z normálních i cirhotických jater byly rozdíly minimální.

Během aktivace HSC došlo k nárůstu exprese mRNA proteinů typických pro fibrotická játra jako je prokolagen typu I, III, V, fibronektin a osteonektin, což potvrzuje výsledky dříve publikované v literatuře (Schuppan, 1990; Frizell, 1995). Vysokou hladinu mRNA zmíněných proteinů ECM jsme prokázali také v MF, což je v souladu s prací Knittela (1999). MF

v porovnání s HSC více exprimují trombospondin-1. Tento glykoprotein interagující s povrchovými receptory buněk, je schopen aktivovat TGF β 1 (Chen, 2000; Breitkopf, 2005).

Z literatury je známo, že právě růstové faktory jako jsou TGF β 1, PDGF β a IGF patří mezi klíčové cytokiny fibrózy jater (Bissell, 2001). V naší práci jsme nezaznamenali rozdíly v expresi TGF β 1, PDGF β , IGF mezi klidovými a in vivo nebo in vitro aktivovanými HSC; naopak exprese v MF byla snížena. Výše zmíněné růstové faktory jsou produkovány po poškození hepatocytů Kupfferovými buňkami, buňkami endotelu sinusoid a monocyty infiltrujícími zánětlivou tkáň. Parakrinně dochází k stimulaci HSC, které se po aktivaci samy zapojují do syntézy cytokinů. TGF β 1 je produkován ve formě propeptidu, vázaný na glykoprotein LTBP, k jeho aktivaci je nutná proteolýza serinovými proteasami nebo přítomnost trombospondinu-1 (Gerard, 2000). Sérové koncentrace TGF β 1 jsou zvýšené u pacientů s fibrózou (Tsushima, 1999). TGF β se váže na buněčné receptory (TGFR), indukuje intracelulární fosforylaci a dimerizaci přenašečů signálu (Smad2, 3), které v jádře modulují expresi řady genů. TGF β indukuje v játrech syntézu složek ECM, fibrilárních kolagenů, fibronektinu, tenascinu, membránových proteoglykanů (perlekanu, biglykanu). Negativně zasahuje do odbourávání ECM tím, že indukuje syntézu TIMP-1 a PAI-1 (Wells, 2000). Zvýšená endogenní syntéza TGF β 1 u transgenních myší vyvolává jaterní fibrózu (Sanderson, 1995), naopak exprese receptoru schopného tento cytokin eliminovat, dokáže experimentálně navozenou fibrózu zvrátit (Nakamura, 2000). Byla popsána vyšší exprese TGF β 1 a jeho receptorů (TGFRI, II, III) v aktivovaných HSC. V myofibroblastech však schopnost receptorů vázat TGF β 1 klesá, což může znamenat, že exprese kolagenu typu I je v MF nezávislá na TGF β 1, jak navrhuje Dooley (2000).

Se signalizací TGF β úzce souvisí přítomnost betaglykanu. V naší práci jsme zjistili, že exprese betaglykanu byla u MF v porovnání s HSC nižší, pokles exprese jsme zaznamenali během kultivace primokultury HSC izolovaných z cirhotických jater. Betaglykan je běžně se vyskytující proteoglykan, vykazuje vysokou afinitu ke všem isoformám TGF β a slouží jako koreceptor TGFRII. Exprese betaglykanu se snižuje během transdiferenciace HSC na MF (Dooley, 2000). I další izoformy TGF β 2 a TGF β 3, mohou mít vliv na aktivaci HSC (Wickert, 2002; Wells, 2004).

Exprese CTGF měla opačný trend než TGF β 1, našli jsme zvýšenou hladinu mRNA u MF ve srovnání s klidovými a aktivovanými HSC. CTGF je další z cytokinů se zvýšenou expresí v cirhotických játrech (Abou-Shady, 2000). Zatímco v hepatocytech je exprese CTGF závislá a stimulovaná TGF β 1, v HSC tomu tak není (Gressner, 2007). CTGF patří do rodiny CCN proteinů, jde o CCN2. Stimuluje migraci, proliferaci a syntézu kolagenu v HSC (Paradis,

2002). V aktivovaných HSC, kterým byla vpravena siRNA namířená proti CTGF, se snížila exprese α SMA, exprese kolagenu typu I a III (Li, 2008).

Osteopontin ve zvýšené míře exprimovaly HSC ve srovnání s MF. Jde o glykoprotein, který obsahuje v molekule RGD sekvence schopné interagovat s integriny a zasahovat do procesů jako je buněčná adheze, migrace, proliferace a působí jako prozánětlivý cytokin (Tokairin, 2008). Kromě HSC je v játrech produkován také Kupfferovými buňkami (Ramaiah, 2008). Exprese osteopontinu v játrech roste po toxickém poškození a in vitro aktivaci HSC na plastiku (Lee, 2004).

Pozorovali jsme snížení hladiny mRNA Syndekanu-4 (Sdc-4) při aktivaci HSC in vivo i in vitro, domníváme se, že tento fakt může přispívat k rozvoji zánětlivé reakce po toxickém poškození jater. U ostatních sledovaných syndekanů jsme změnu exprese nezaznamenali. Sdc 4 je transmembránový proteoglykan, řetězci heparan sulfátů je schopen vázat růstové, antikoagulační faktory a také Spp. Komplex Sdc-4/Spp znemožňuje štěpení trombinem a následnou vazbu na integriny $\alpha 4 \beta 1$ a $\alpha 5 \beta 3$ (Kon, 2008). Významná role Sdc-4 se ukázala při pokusech na myších s vyřazeným Sdc-4 genem, játra byla po aplikaci hepatotoxinu z histologického i funkčního hlediska více poškozena (Kon, 2008). Perlekan, další z proteoglykanů, byl silně exprimován v aktivovaných HSC i MF.

MF se liší od HSC sníženou expresí podjednotek integrinu $\alpha 6$ - jednoho z receptorů pro laminin a $\beta 3$ části integrinu vazujícího vitronektin a trombospondin, což může být důsledek kultivace se ztrátou kontaktu buněk s basální laminou. MF exprimují více mRNA fibronektinu i vazujícího integrinu $\alpha 5$ než HSC. Integriny zprostředkovávají komunikaci mezi buňkou a ECM, proteiny procházející buněčnou membránou. Jde o heterodimery složené z podjednotek α a β . HSC exprimují $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 8 \beta 1$ (Carloni, 1996; Levine, 2000).

Exprese fibrilinu-1 a elastinu se významně nezvýšila u žádné subpopulace sledovaných buněk. Fibrilin-1 je součástí mikrofibril, spolu s elastinem se vyskytují v normálních játrech (v Disseho prostoru podél sinusoid i v portální oblasti) v cirhotických játrech jsou součástí vazivových sept (Dubuisson, 2001; Kanta, 2002). Akumulace těchto proteinů může být způsobena principiálně dvěma mechanismy. Může jít o snížení aktivity metaloproteinás, ať už z důvodu nižší exprese nebo zvýšením aktivity inhibitorů MMP. Druhou možností je zvýšení produkce fibrilinu-1 a elastinu jiným typem neparenchymálních buněk.

Kromě změn exprese proteinů, proteoglykanů a glykoproteinů v HSC a MF jsme sledovali změny v expresi metaloproteinás, a to konkrétně MMP-2, 3, 7, 9, 12, 13, 14. Klidové HSC exprimovaly všechny mRNA všech zmíněných MMP, s aktivací se exprese (kromě MMP-2

a 14) dramaticky snížila, u MF až do pomoci oligocDNA arayı nedetekovatelné míry. Hladina mRNA pro MMP-2 se s aktivací HSC na platu neměnila, v HSC izolovaných z cirhotických jater byla po dvoudenní kultivaci vyšší než u buněk pocházejících z jater normálních. Expresi MMP-14 vykazovaly všechny typy buněk bez statisticky významných rozdílů, jen v HSC izolovaných z cirhotických jater byla po dvoudenní kultivaci nižší než u buněk pocházejících z jater normálních.

MMP-2 a 9 se označují také jako želatinasy A a B. MMP-2 se podílí na degradaci normální subendotelové matrix a usnadňuje tím ukládání kolagenu typu 1, zvýšená exprese byla detekovaná při experimentálně navozené fibróze i u pacientů s chronickou hepatitidou, s rozvojem cirhózy klesá (Takahara, 1997). Je známo, že pro MMP-2 produkují také aktivované HSC (Théret, 1997). Na povrchu buněk dochází i interakci s MMP-14 a TIMP-2 za vzniku trimolekulárního komplexu (Strongin, 1995), nezbytného pro aktivaci latentní formy MMP-2. Aktivované HSC produkují všechny složky tohoto komplexu. Kolagen typu 1 indukuje aktivaci pro MMP-2 (Theret, 1997). MMP-9 je produkována převážně Kupferovými buňkami a také klidovými HSC (Takahara, 2003), její aktivace je závislá na plasminu a stromelysinu. MMP-13 je intersticiální kolagenasa potkanů. Expresi MMP-9 a 13, detekovaná u HSC po izolaci, klesá s délkou kultivace (Knittel, 1999). MMP-7 a MMP-12 degradují nativní a denaturovaný kolagen, elastin, proteoglykany a glykoproteiny (Iredale, 1996; Arthur, 1998).

Souhrnem můžeme konstatovat, že klidové HSC mají fenotyp podporující degradaci ECM, což je v souladu s pracemi Iredale, 1996; Vyas, 1995. Aktivované HSC a MF mají nižší expresi MMP s výjimkou MMP-2 a 14. MMP-2 byla detekována ve fibrotických játrech (Watanabe, 2001), kde přispívá zřejmě k remodelaci Disseho prostoru a infiltraci MF do tkáně. Pro MF nemáme v literatuře patřičné srovnání, od aktivovaných HSC se v našich experimentech lišila pouze nižší expresí MMP-12.

Jak bylo zmíněno výše aktivita MMP je regulována dvěma hlavními endogenními inhibitory A2M a TIMP, dosud byly identifikovány TIMP-1 až 4. Expresi A2M byla u obou typů MF nižší než u aktivovaných HSC. Toto zjištění je v souladu s obecně přijímaným faktem, že aktivované HSC a MF mají fenotyp podporující akumulaci ECM. Bylo popsáno, že s aktivací se exprese TIMP-1 a 2 zvyšuje (Benyon, 1996, Iredale, 1995, 1996). V našich experimentech jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v hladinách mRNA TIMP. U TIMP-2 se exprese se však pohybuje na horní hranici detekce, kde dochází k vysycení vazebné kapacity spotu a další změny směrem k vyšším hodnotám nejsou měřitelné.

Výsledky získané oligo cDNA arayí jsou přínosem v celkovém náhledu na jednotlivé subpopulace buněk. Metoda sice nemá tak vysoký dynamický rozsah, pro některé sledované geny (ty které jsou na dolní i horní hranici detekce) by bylo vhodnější upravit množství vstupní mRNA potažmo cDNA. Při ponechání šesti typů testovaných buněk s daným počtem opakování by to bylo však finančně i z hlediska hodnocení velmi náročné.

6.3. Vliv kolagenního a fibrinového gelu na expresi genů MF

Aktivace HSC a jejich následná transdiferenciace na MF je složitý děj, kterého se in vivo účastní okolní buňky prostřednictvím cytokinů a růstových faktorů, apoptických fragmentů a ROS. Důležité signály buňkám poskytuje i ECM. Změna fyzikálních vlastností (Wells, 2005) i zastoupení složek ECM, která obklopuje HSC ovlivňuje jejich chování. Řada prací se zabývá vlivem trojrozměrného kultivačního prostředí, a to především kolagenního gelu a Matrigelu na morfologii, proliferaci a expresi genů HSC. Kolagenní gel působí na HSC spíše aktivačně, kultivace HSC v Matrigelu má naopak deaktivující efekt (Gaca, 2003). Vliv kultivace ve fibrinovém gelu na HSC nebyl dosud studován. V literatuře jsme nenašli práce, které by se zabývali kultivací MF v trojrozměrné matrix. Z toho důvodu jsme se rozhodli zjistit, zda a jak trojrozměrný kultivační systém ovlivní morfologii a expresi genů MF.

I my jsme pozorovali, že se po přenosu MF z plastu do gelů mění morfologie, podobně jak popsal Li (1999). Na plastu byly MF velké polygonálního tvaru, v gelech menší s podlouhlými těly. MF v kolagením gelu měly tendenci se shlukovat, ve fibrinovém gelu rostly izolovaně a byly větší a s více výběžky než v gelu kolagenním.

Expresi genů MF ve fibrinovém a kolagením gelu jsme studovali pomocí oligo cDNA arayí a rtRT-PCR. Nezaznamenali jsme změny v produkci mRNA fibrilárního kolagenu typu I a III ani kolagenu typu IV po přenosu MF do gelů. Kolagenní gel snížil expresi kolagenu typu XII v MF, který patří mezi FACIT kolageny, tedy kolageny asociovanými s fibrilárními typy. Porovnáme-li s literárními údaji o HSC zjistíme, že lépe proliferují a syntetizují více kolagenu na plastu potaženém kolagenem typu I ve srovnání s kultivací na plastu. Produkce kolagenu v kolagením gelu je částečně utlumena (Senoo, 1996).

Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že zatímco exprese strukturálních proteinů ECM jako jsou kolageny, fibronectin a laminin nebyla kultivací v trojrozměrné matrix ovlivněna, exprese matricelulárních proteinů (osteonektin, osteopontin, trombospondin, galektin) se změnila. Matricelulární proteiny - proteiny schopné vázat buněčné receptory,

složky ECM, růstové faktory, cytokiny a proteas - jsou exprimované během embryogeneze nebo za patologických stavů (Bornstein, 2009).

Kolagenní gel stimuloval expresi osteopontinu, galektinů-1 a 3 a snížil expresi trombospondinu-2. Ve fibrinovém gelu exprese osteopontinu klesla, naopak exprese osteonektinu a trombospondinu 1 stoupla. Zaujal nás opačný trend v expresi osteopontinu. Zvýšení exprese osteopontinu v kolagenním gelu koreluje se zvýšením exprese MMP-2, MMP-9 a MMP-14, které u MF ve fibrinovém gelu nenastalo. Osteopontin ovlivňuje důležité buněčné procesy jako adheze, migrace, proliferace, významně se uplatňuje při metabolismu kostí a angiogenezi. Jak bylo zmíněno, výše exprese osteopontinu v játrech roste po toxickém poškození a *in vitro* aktivací HSC na plastiku (Lee, 2004). Zvýšené sérové hladiny osteopontinu byly nalezeny u pacientů s karcinomem plic, prsu, tlustého střeva, prostaty a hepatocelulárním karcinomem (Das, 2005). Osteopontin se váže na integrin $\alpha\beta3$, způsobuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a jeho translokaci do jádra a jím podmíněnou expresi MMP-2 a uPA v buněčné linii hepatocelulárního karcinomu (Sun, 2008). Přidání rekombinantního osteopontinu k buněčné kultuře HSC na plastiku zvyšuje expresi i produkci MMP-2, zvyšuje také produkci MMP-14, TIMP-2 a kolagenu typu I (Lee, 2004). TIMP 2, MMP-14 a MMP-2 tvoří trimolekulární komplex nutný pro aktivaci MMP-2, následná lokální proteolýza ECM umožňuje migraci buněk v tkáni. Transkripční faktory NF- κ B a AP-1 zvyšují expresi MMP-9 v aktivovaných HSC kultivovaných v kolagenním gelu (Takahara, 2004).

Zvýšená exprese MMP-2, MMP-9 a MMP-14 v MF připomíná chování HSC v kolagenním gelu, kde exprese MMP-2, MMP 14 a TIMP-2 roste (Wang, 2002). Jiní autoři uvádějí indukci exprese MMP-3, 9, 13, 14, zatímco MMP-2 není ovlivněna (Takahara, 2003). Domníváme se, že zvýšení exprese MMP-2, MMP-9 a MMP-14 v MF v kolagenním gelu může souviset se zvýšenou expresí osteopontinu. Zda v tomto procesu hraje klíčovou roli NF κ B nebo jiné transkripční faktory bude nutné v budoucnosti osvětlit. Ačkoli PAI-1 také patří mezi geny, jejichž exprese může být stimulována NF κ B, MF v gelech exprimovaly méně mRNA pro PAI 1 v porovnání s buňkami na plastu. Plasmin, jehož produkce je závislá na aktivátoru plasminogenu u-PA a jeho inhibitech PAI-1 a 2, je proteasa schopná degradovat fibrin, fibronektin, laminin a kolagen typu IV. Významně reguluje aktivaci proenzymů MMP. Porušení rovnováhy mezi složkami regulačního systému plasminu je spjaté s fibrózou.

Expresa trombospondinu (TSP-2) v MF na kolagenním gelu klesla, u MF ve fibrinovém gelu nebyla ovlivněna. TSP-2 působí dle literatury opačným efektem než osteopontin, je považován za negativní endogenní regulátor angiogeneze a tumorigeneze. Snížená exprese TSP-2 zvyšuje aktivitu MMP-2 *in vitro* i *in vivo*. TSP-2 se váže na MMP-2 a usnadňuje

endocytózu zprostředkovanou receptorem pro LDL lipoproteiny LRP-1 a následnou degradaci v lysosomech (Bornstein, 2004). Studie na transformovaných buňkách maligního melanomu exprimujících TSP-2 vysvětluje jejich sníženou invazivitu zvýšenou expresí PAI-1 (Chijiva, 2009). TSP-2 je důležitý pro správné formování kolagenních fibril typu I v kůži (Bornstein, 2004).

Hmota fibrinových a kolagenních gelů byla po týdnu solubilizována z jedné šestiny resp. jedné poloviny, což dokládá aktivaci metaloproteinů v MF. Domníváme se, že se MF stejně jako HSC mohou zapojovat do remodelace jaterní ECM. S vyžíváním kolagenní matrix v játrech je však spojena její stabilizace tvorbou příčných vazeb – zesíťováním za pomoci tkáňové transglutaminasy, což zvyšuje její odolnost vůči proteolytickým enzymům (Zhou, 2006).

MF v kolagenním gelu exprimovaly více mRNA TGFβ1, ale exprese TGFβ2 a TGFβ3 se snížila. V předchozí kapitole byly popsány vliv TGFβ1 na aktivaci HSC a rozvoj fibrózy. HSC exprimují i ostatní izoformy TGFβ, které působí opačně. Zatímco zvýšená exprese TGFβ1 je spojená se zvýšenou produkcí kolagenu typu I, zvýšená exprese TGFβ3 snižuje syntézu kolagenu in vitro i in vivo a zvyšuje expresi MMP-9, ale tlumí expresi TIMP-1 (Zhang, 2010). Mechanismus, jakým trojrozměrný kolagenní gel ovlivňuje jejich expresi, zatím není objasněn. V lidských dermálních fibroblastech kultivace v kolagenním gelu stimuluje translokaci p53, podjednotky transkripčního faktoru NFκB, do jádra (Xu, 1998).

Expese CTGF v MF na kolagenním gelu klesla. CTGF patří do rodiny CCN proteinů, jde o CCN2. Stimuluje migraci, proliferaci a syntézu kolagenu v HSC (Paradis, 2002).

7. SHRUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

HSC jsme izolovali z normálních a cirhotických jater potkanů. K aktivaci HSC in vitro jsme využili obecně přijímaný model - kultivaci na plastovém podkladu. Získali jsme tak HSC s odlišnými fenotypy – klidové, aktivované in vitro a aktivované in vivo. Dalším buněčným typem, na který jsme se zaměřili, byly myofibroblasty. MF tvoří po izolaci minoritní část neparenchymové buněčné frakce, následkem omezené schopnosti HSC proliferovat v buněčné kultuře po 4 pasážích převládnu. MF a HSC se liší morfologicky i při imunocytochemickém barvení, HSC dávají pozitivní reakci na desmin, MF jsou desmin-negativní.

HSC aktivované kultivací na plastiku ve srovnání s klidovými HSC exprimovaly ve větší míře geny pro složky extracelulární matrix (kolageny typu I, III a V), perlekan, fibronectin a osteopontin. Naopak nižší exprese byla patrná především u metaloproteinas (MMP-3, 9, 13 a 14). Exprese genů v HSC čerstvě izolovaných z cirhotických jater se blížila expresi genů v HSC z normálních jater aktivovaných kultivací na plastiku. HSC v cirhotických játrech jsou tedy již do značné míry aktivovány v obdobném smyslu. Během několikadenní kultivace se cirhotické HSC v aktivaci úplně vyrovnaly normálním HSC.

Srovnání MF a aktivovaných HSC naznačilo, že jde o dva typy buněk s různou funkcí. Pozorovali jsme značné zvýšení exprese markeru MF fibulinu-2. Exprese řady proteinů a proteoglykanů (fibronectinu, osteopontinu, kolagenu I, vitronektinu, osteonektinu) byla v MF vyšší, exprese metaloproteinas (MMP-7, 12) naopak nižší. Souvisí to možná s rozdílnou expresí cytokinů (CTGF, PDGF- β). Nebyl nalezen rozdíl mezi MF z cirhotických a z normálních jater.

V organismu jsou buňky uloženy v trojrozměrné matrix. Kultivovali jsme proto MF ve fibrinovém nebo kolagenním gelu. Zjistili jsme, že jak fibrinový gel tak zejména gel tvořený kolagenem typu I podstatně ovlivňuje expresi genů v těchto buňkách i jejich morfologii. V MF se zvýšila exprese metaloproteinas, což se projevilo zvýšenou schopností MF solubilizovat gely, v nichž byly ponořeny. Trojrozměrná matrix ovlivnila také expresi matricelulárních proteinů jako jsou osteopontin a trombospondin-2, jež zasahují do regulace procesu remodelování tkání, a způsobila významné posuny v expresi cytokinů spojených s fibrogenezí.

8. ZÁVĚR

V naší práci jsme se věnovali studiu jaterních hvězdicových buněk a jaterních myofibroblastů.

Porovnávali jsme změny exprese genů, které provázejí aktivaci HSC in vitro s těmi, které se odehrávají v HSC při vzniku jaterní cirhózy u modelu toxického poškození jater. Aktivace in vitro na plastické podložce je obecně přijímaný model pro studium HSC. Aktivované HSC se vyznačovaly pozitivitou na α -SMA a profibrogenním fenotypem – vysokou expresí strukturálních proteinů ECM s převahou kolagenu typu I a III a nízkou expresí enzymů schopných degradovat ECM - metaloproteinas. Spektrum genů exprimovaných v HSC izolovaných z cirhotických jater se do značné míry shodovalo se spektrem genů v HSC aktivovaných in vitro, což ukazuje na oprávněnost tohoto modelu.

Ze zdravých i cirhotických jater jsme vykultivovali i subpopulaci jaterních myofibroblastů. MF jsou ve srovnání s HSC méně studovaný typ neparenchymových jaterních buněk. Jedním z důvodů může být jejich heterogenita, absence specifického markeru i nejednotnost izolačních technik. Analýza genové exprese ukazuje, že jde o buňky s fenotypem, který může podporovat fibrogenézi, avšak obraz exprese genů je u těchto buněk jiný, než je tomu u aktivovaných HSC. MF mohou tedy v játrech plnit poněkud jinou funkci než HSC.

Přirozeným prostředím pro jaterní buňky je trojrozměrná matrix gelovitého charakteru. Jako model extracelulární matrix jsme použili fibrinový, respektive kolagenní gel. Kultivace MF v gelech podstatně ovlivnila jak jejich morfologii, tak expresi genů. Výrazný vliv měl zejména kolagenní gel, který byl díky zvýšené produkci a sekreci metaloproteinas do značné míry solubilizován. Ovlivněna byla také jiných proteinů extracelulární matrix spolu s expresí cytokinů a růstových faktorů. Výzkum chování neparenchymových buněk v trojrozměrném kultivačním prostředí by mohl vést k lepšímu pochopení mechanismů vzniku fibrózy a cirhózy jater a k možnosti aplikovat poznatky v její léčbě.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -SMA	α aktin hladkého svalu
A2M	α 2-makroglobulin
APC	buňky prezentující antigen
CCl ₄	tetrachlormethan
CSF	faktor stimulující progenitorové buňky
CSPG	chondroitinsulfát proteoglykan
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně
DSPG	dermatansulfát proteoglykan
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
ET	endotelin
FAK	fokální adhezivní kinasa
FGF	růstový faktor fibroblastů
GAG	glykosaminoglykany
GFAP	kyselý gliový fibrilární protein
HCV	hepatitida C
HGF	růstový faktor hepatocytů
HSC	jaterní hvězdicové buňky
HSPG	heparansulfát proteoglykan
ICAM	mezibuněčná adhezní molekula
IGF	inzulínu podobný růstový faktor
IL-1	interleukin-1
iMF	interface myofibroblasty
MCP	monocytární chemotaktický peptid
MMP	metaloproteinasy
NASH	nealkoholová steatohepatitida
NCAM	neurální adhezní protein
NF κ B	nukleární faktor κ B
PA	aktivátory plasminogenu
PAI-1	inhibitor aktivátoru plasminogenu 1
PDGF	destičkový růstový faktor
pMF	portální myofibroblasty

RARE	responzivní elementy pro kyselinu retinovou
RBP	protein vázající retinol
ROS	reaktivní formy kyslíku
sMF	septální myofibroblasty
SPARC	osteonectin
TGF- β 1	transformující růstový faktor β
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteinás
TNF α	faktor nádorové nekrózy
V-CAM	vaskulární adhezní protein
VEGF	růstový faktor endotelových buněk

10.LITERATURA

1. Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Büchler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver*. 2000; 20: 296-304
2. Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology*. 1994; 20: 494-51
3. Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion*. 1998; 59: 376-80
4. Baba S., H. Fujii, T. Hirose, K. Yasuchika, H. Azuma and T. Hoppo et al., Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse, *J Hepatol*. 2004; 40: 255–260
5. Bachem MG, Melchior R, Gressner AM. The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1989; 27: 555-65
6. Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest*. 1992; 89: 19-27
7. Bansal MB, Kovalovich K, Gupta G, Lic W, Agarwal A, Radbill B, Alvarez CE, Safadi R, Fiel MI, Friedmann SL, Taub RA: Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl4-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *J. Hepatol*. 2005; 42: 548-556
8. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209-18
9. Bauer M, Schuppan D. TGFβ1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett*. 2001; 502:1-3
10. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol*. 2003; 200: 504-15
11. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001; 21: 373-84
12. Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology*. 1996; 110: 821-31
13. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology*. 2001; 34: 859-6
14. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EM, Piantedosi R, Libien J. Hepatic stellate cell lipid droplets: a

specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791: 467-73

15. Blaner WS.: STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metab*. 2007; 5: 164-6.
16. 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. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 1115-25
17. Bornstein P. Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal*. 2009;3: 163-5
18. Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut*. 2005; 54:673-81
19. Brenner DA.: Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009; 120: 361-8
20. Brozman M., Ondruš, B.: Úvod do histopatológie: príručka pre lekárske fakulty. 5 vyd. Martin : Osveta, 1976, s. 323-330
21. Buniatian G, Hamprecht B, Gebhardt R. Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol. Cell*. 1996; 87: 65-73
22. Burton LK, Kramer S, Trott NG. Radioactive isotopes in the localisation of brain tumours. *Acta radiol*. 1956; 46: 415-24
23. Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, Laffi G, Gentilini P. Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 1996; 110: 1127-36
24. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol*. 2002; 36: 200-9
25. Cassiman D, van Pelt J, de Vos R, van Lommel F, Desmet V, Yap S-H, Roskams T. Synaptophysin: a novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol*. 1999; 155: 1831-1839
26. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: its role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life*. 2005; 57: 441-7
27. De Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, Knook DL. Purified rat liver fat-storing cells in culture divided and contain collagen. *Hepatology*. 1984; 4: 392-403
28. De Minicis S, Brenner DA. NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 462: 266-72

29. Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology*. 2000; 31: 1094-1106
30. Dubuisson L, Lepreux S, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Costa AM, Rosenbaum J, Desmoulière A. Expression and cellular localization of fibrillin-1 in normal and pathological human liver. *J Hepatol*. 2001; 34: 514-22
31. Ehrmann J, Hůlek P. *Hepatologie*. 1 vydání. Praha: Grada Publishing, 2010. s: 25-27;53;400
32. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 1972; 54: 626-37
33. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 411-24
34. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2004;126: 955-63
35. Friedmann SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem*. 2000; 257: 2247-2250
36. Friedman SL. Reversing hepatic fibrosis. *Science & Medicine*. 2002; 8: 194-205
37. Frizell E, Liu SL, Abraham A, Ozaki I, Eghbali M, Sage EH, Zern MA. Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology*. 1995; 21: 847-54
38. Gaça MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol*. 2003; 22: 229-39
39. Galambos J. T. Classification of cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol*. 1975; 64: 437-451
40. Graham JM. Fractionation of hepatic nonparenchymal cells. *ScientificWorldJournal*. 2002; 2: 1347-50
41. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002; 1;7:d793-807
42. Gressner A. M.: Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J. Hepatol*. 1995, 22: 28–36.
43. Gressner OA, Lahme B, Demirci I, Gressner AM, Weiskirchen R. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol*. 2007; 47: 699-710

44. Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23: 1024-35
45. Hellemans K, Grinko I, Rombouts K, Schuppan D, Geerts A. All-trans and 9-cis retinoic acid alter rat hepatic stellate cell phenotype differentially. *Gut.* 1999; 45: 134–142
46. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol.* 2007; 46: 955-75
47. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000; 19: 597-614
48. Chijiwa T, Abe Y, Ikoma N, Yamazaki H, Tsukamoto H, Suemizu H, Kawai K, Wakui M, Nishime C, Matsumoto H, Matsuyama M, Mukai M, Ueyama Y, Nakamura M. Thrombospondin 2 inhibits metastasis of human malignant melanoma through microenvironment-modification in NOD/SCID/gammaCnull (NOG) mice. *Int J Oncol.* 2009; 34: 5-13
49. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-9
50. Ijzer J, Roskams T, Molenbeek RF, Ultee T, Penning LC, Rothuizen J, van den Ingh TS. Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. *Comp Hepatol.* 2006; 5: 7
51. Imai K, Sato T, Senoo H. Adhesion between cells and extracellular matrix with special reference to hepatic stellate cell adhesion to three-dimensional collagen fibers. *Cell Struct Funct.* 2000; 25: 329-36
52. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 1996; 24: 176-84
53. Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond).* 1995; 89: 75-81
54. Iredale JP. Matrix turnover in fibrogenesis. *Hepatogastroenterology.* 1996; 43:56-7
55. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest.* 1998; 102: 538-49
56. Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 43-54

57. Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP.: Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*. 2001; 48: 548-57
58. Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1795-808
59. Jarnagin W. R., Rockey D. C., Koteliansky V. E., Wang S. S., Bissell D. M.: Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the E IIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J. Cell. Biol.* 1994, 127: 2037-2048
60. Jiang Y, Liu J, Waalkes M, Kang YJ. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice. *Toxicol Sci*. 2004; 79: 404-10
61. Jiroutová A, Majdiaková L, Čermáková M, Köhlerová R, Kanta J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic liver. *Acta Med. (Hradec Králové)* 48, 137-144 (2005)
62. Jiroutova A, Slavkovsky R, Cermakova M, Majdiakova L, Hanovcova I, Bolehovska R, Hajzlerova M, Radilova H, Ruszova E, Kanta J.: Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol*. 2007; 58: 263-73
63. Kanta J, Dooley S, Delvoux B, Breuer S, D'Amico T, Gressner AM. Tropoelastin expression is up-regulated during activation of hepatic stellate cells and in the livers of CCl₄-cirrhotic rats. *Liver*. 2002; 22: 220-7
64. Kawada N, Tran TT, Decker K. The concentration of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur. J. Biochem*. 1993; 213: 815-823
65. Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol*. 2005; 166: 1017-28
66. Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest*. 2000;80: 697-707
67. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2006; 45: 429-38
68. Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol*. 1999; 112: 387-401.

69. 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-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol.* 1999; 30: 48-60
70. Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, Kurotaki D, Diao H, Matsui Y, Segawa T, Maeda M, Kojima T, Uede T. Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med.* 2008; 205: 25-33
71. Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 2367-78
72. Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99: 271-9
73. Levine D, Rockey DC, Milner TA, Breuss JM, Fallon JT, Schnapp LM. Expression of the integrin alpha8beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1927-35
74. Li D., Friedmann S. L. Hepatic stellate cells: morphology, function and regulation. *The liver: Biology and Pathobiology.* Philadelphia: 4 vyd. Lippincott Williams and Wilkins, 2001, s 455-468
75. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.* 1998; 393: 276-80
76. Li G, Li D, Xie Q, Shi Y, Jiang S, Jin Y. RNA interfering connective tissue growth factor prevents rat hepatic stellate cell activation and extracellular matrix production. *J Gene Med.* 2008; 10: 1039-47
77. Li YL, Sato M, Kojima N, Miura M, Senoo H. Regulatory role of extracellular matrix components in expression of matrix metalloproteinases in cultured hepatic stellate cells. *Cell Struct Funct.* 1999; 24: 255-61
78. Liu XJ, Yang L, Luo FM, Wu HB, Qiang Q. Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1600-7
79. Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999; 29: 140-8
80. Masopust J, Průša R. *Patobiochemie buňky.* 1 vydání. Praha 2003. s: 61-68
81. McClain C J, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287: G497-G502

82. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18: 516-23
83. Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2001; 36: 399-406
84. 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. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11069-76
85. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008;29: 290-308
86. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology.* 2000; 32: 247-55
87. Neubauer K, Knittel T, Armbrust T, Ramadori G. Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury. *Gastroenterology.* 1995; 108: 1124-35
88. Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein-a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol.* 1996; 24: 719-30
89. Niki T., Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999; 29, 520–527
90. 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. *Histochem Cell Biol.* 2007; 127: 161-74
91. Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K.: Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med.* 2001; 50: 58-65
92. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol.* 1998; 29: 836-47
93. 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. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1369-78
94. Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest.* 2002; 82:767-74

95. Pardes JB, Takagi H, Martin TA, Ochoa MS, Falanga V.: Decreased levels of alpha 1(I) procollagen mRNA in dermal fibroblasts grown on fibrin gels and in response to fibrinopeptide B. *J Cell Physiol.* 1995;162: 9-14
96. Pelikán V. *Patologická fyziologie jater.* 1 vyd. Praha: Avicenum, 1973, s. 139-151
97. Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 1996; 110: 534-4
98. Povero D, Busletta C, Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Paternostro C, Parola M. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol.* 2010; 25: 1075-91
99. Příbramská V, Trumpešová H. Nealkoholická steatohepatitida – součást metabolického syndromu. *Med Pro Praxi.* 2008; 5: 193–195
100. Příbramská V. Jaterní cihóza. *Interní Med.* 2007; 9: 486–489
101. Ramadori G, Knittel T, Saile B. Fibrosis and altered matrix synthesis. *Digestion* 1998, 59: 372-375
102. Ramadori G, Saile B. Mesenchymal cells in the liver--one cell type or two? *Liver.* 2002; 22: 283-94
103. Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci.* 2008; 103: 4-13
104. Rockey DC. Characterization of endothelin receptors mediating rat hepatic stellate cell contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207: 725-31
105. Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol.* 1997; 151: 1265-72
106. Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkappaB and p53/p21/WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol.* 2001; 80: 554-61
107. Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999; 30: 196-202
108. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2572-6

109. Sato M, Sato T, Kojima N, Imai K, Higashi N, Wang DR, Senoo H. 3-D structure of extracellular matrix regulates gene expression in cultured hepatic stellate cells to induce process elongation. *Comp Hepatol*. 2004; 3 Suppl 1:S4.
110. Sato M, Suzuki S, Senoo H: Hepatic Stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and function*. 2003; 28: 105-112
111. Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formation. *Kaibogaku Zasshi*. 1994; 69: 719-33
112. Senoo H, Imai K, Matano Y, Sato M. Molecular mechanisms in the reversible regulation of morphology, proliferation and collagen metabolism in hepatic stellate cells by the three-dimensional structure of the extracellular matrix. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998; 13: 19-32
113. Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Hata R. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol Int*. 1996; 20: 501-12
114. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis*. 1990; 10: 1-10
115. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516
116. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995; 270: 5331-8
117. Sun BS, Dong QZ, Ye QH, Sun HJ, Jia HL, Zhu XQ, Liu DY, Chen J, Xue Q, Zhou HJ, Ren N, Qin LX. Lentiviral-mediated miRNA against osteopontin suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 48: 1834-42
118. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005; 25: 779-86
119. Svegliati-Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, DiSario A, Salzano R.: Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1998, 27: 720-6
120. Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology*. 1997; 26:1521-9
121. Takahara T, Zhang LP, Yata Y, Xue F, Minemura M, Sato H, Watanabe A. Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: its activation and signaling pathway. *Hepatol Res*. 2003; 26: 318-326

122. Takahara Y, Takahashi M, Wagatsuma H, Yokoya F, Zhang QW, Yamaguchi M, Aburatani H, Kawada N. Gene expression profiles of hepatic cell-type specific marker genes in progression of liver fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:6473-99
123. Takahra T, Smart DE, Oakley F, Mann DA. Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 353-63
124. Tamayo R. P. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology.* 1983; 3: 112-120
125. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2010; 51: 1027-36
126. Théret N, Lehti K, Musso O, Clément B. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999; 30: 462-8
127. Théret N, Musso O, L'Helgoualc'h A, Clément B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol.* 1997; 150: 51-8
128. Tokairin T, Nishikawa Y, Watanabe H, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, Yoshida M, Nishimura T, Li Q, Arai H, Ishida A, Takada G, Enomoto K. Osteopontin expression in the liver with severe perisinusoidal fibrosis: autopsy case of Down syndrome with transient myeloproliferative disorder. *Pathol Int.* 2008; 58: 64-8
129. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Doi Y, Yamada A, Oshikawa O, Matsuzawa Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *J Hepatol.* 1999; 30: 1-7
130. Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 4214-24
131. Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol.* 1997; 109, 96-101
132. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-39
133. Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal.* 2006; 18: 1108-16
134. Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Lymphocyte trafficking in inflamed liver. *APMIS Suppl.* 1991; 23: 53-67
135. Vyas SK, Leyland H, Gentry J, Arthur MJ. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology.* 1995; 109: 889-98

136. Wang DR, Sato M, Li LN, Miura M, Kojima N, Senoo H. Stimulation of pro-MMP-2 production and activation by native form of extracellular type I collagen in cultured hepatic stellate cells. *Cell Struct Funct.* 2003; 28: 505-13
137. Wang DR, Sato M, Sato T, Kojima N, Higashi N, Senoo H. Regulation of matrix metallo-proteinase expression by extracellular matrix components in cultured hepatic stellate cells. *Comp Hepatol.* 2004; 3; Suppl 1:S20
138. Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Kameyama K, Hayashi T, Arai M, Ishikawa A, Maruyama K, Okazaki I. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol.* 2000; 33: 224-35
139. Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol.* 2001; 35: 465-73
140. Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol.* 199; 112: 1205-13
141. Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett.* 2004; 559:107-10
142. Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: G845-50
143. Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39: S158-61
144. Wickert L, Steinkrüger S, Abiaka M, Bolkenius U, Purps O, Schnabel C, Gressner AM. Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF-beta-isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295: 330-5
145. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214: 199-210
146. Xu J, Zutter MM, Santoro SA, Clark RA. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappaB in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. *J Cell Biol.* 1998; 140: 709-19
147. Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res.* 1993; 204: 121-9
148. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.* 2003; 124: 147-59

149. Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Jin B, Watanabe A. Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol.* 1999; 30: 425-32
150. 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
151. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007; 282: 23337-47
152. Zhang Y, Liu P, Gao X, Qian W, Xu K. rAAV2-TGF- β (3) decreases collagen synthesis and deposition in the liver of experimental hepatic fibrosis rat. *Dig Dis Sci.* 2010; 55: 2821-30
153. Zhou X, Jamil A, Nash A, Chan J, Trim N, Iredale JP, Benyon RC. Impaired proteolysis of collagen I inhibits proliferation of hepatic stellate cells: implications for regulation of liver fibrosis. *J Biol Chem.* 2006; 281: 39757-65.

11.PŘÍLOHY

- 11.1. Jiroutova A, Majdiakova L, Slavkovsky R, Rezacova M, Cerman J, Micuda S, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. Tissue Cell. (v recenzním řízení)**

Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts

Mgr. A. Jiroutova^a, L. Majdiakova^a, R. Slavkovsky^{a,b}, M. Rezacova^a, J. Cerman^a, S. Micuda^c, J. Kanta^{a*}

^a Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

^b Laboratory of Wound Healing, CPN, 561 02 Dolni Dobrouc, Czech Republic

^c Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

Running title: Collagenolysis by liver myofibroblasts

Key words: type I collagen gel, fibrin gel, gene expression, liver myofibroblasts; matrix metalloproteinases

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank to Dr. E. Cermakova for the statistical evaluation of the results. Technical help of Ms M. Hajzlerova and of Ms P. Kazimirova is gratefully acknowledged. This work was supported by grants from the Grant Agency of Charles University No. 86/2006/C/LFHK and from the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No. MSM 0021620820.

Original article

- Corresponding author. Tel.: +420 49 5816 293; fax: +420 49 5512 715.
Email address: kanta@lfhk.cuni.cz (J. Kanta)

A B S T R A C T

Rat liver myofibroblasts (MFB) were obtained by 4 passages of hepatic stellate cell fraction. They were embedded in fibrin or in type I collagen sandwich gels for 5 days. MFB were large and spread on plastic substrate, with prominent α -smooth muscle (α -SMA) fibres. They turned much smaller and elongated in collagen. The change in cell shape and the rearrangement of the cytoskeleton was accompanied by a decrease in α -SMA and β -actin as determined by Western analysis. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein level was higher in collagen while that of cytochrome c decreased. Collagen gels were degraded by 51% after 5 days. Real time RT-PCR analysis showed that mRNA expression of a group of metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, -13, -14) increased, but plasminogen activator inhibitor-1 expression decreased. MMP-13 mRNA and protein showed the highest increase. The expression of collagen types I and IV did not change. Significant changes in the expression of cytokines IL-6, TGF- β 1, - β 2, - β 3 and CTGF were found. The effects of fibrin gels on MFB were milder than those of collagen. MFB assumed to deposit collagen and other ECM components in fibrotic liver possess a great collagenolytic potential that is revealed when they are grown in threedimensional collagen gel.

1. Introduction

Excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) is a characteristic feature of liver fibrosis. Various types of myofibroblastic cells are probably responsible for this process

(Guyot et al., 2006, Parola et al., 2008). Quiescent hepatic stellate cells (HSC) are activated in injured liver and change their phenotype to myofibroblast-like. HSC that store vitamin A in normal liver proliferate, become sensitive to PDGF, TGF- β and other cytokines and begin to synthesize collagen and other ECM components (Pinzani and Gentilini, 1999).

Besides HSC, also myofibroblasts (MFB) participate in the formation of connective tissue septa in fibrotic liver (Kinman and Housset, 2002). MFB differ from HSC in the expression of certain antigens and in the localization in the developing fibrotic septa (Knittel et al., 1999a). HSC can be maintained in culture for two passages while MFB allow prolonged cultivation (Knittel et al., 1999b). MFB can be isolated by repeated passaging of HSC fraction of liver cells. Both activated HSC and MFB contain α -smooth muscle actin fibers but MFB are desmin-negative. The expression of the genes coding for the proteins related to connective tissue metabolism is also different in these two cell types (Jiroutova et al., 2007).

The adhesion of cells to three-dimensional (3D) ECM differs from that observed in classical cell culture on two-dimensional substrates such as polystyrene dishes. The involvement of integrins and the function of cells are changed (Cukierman et al., 2001). Cell morphology is also greatly affected by ECM (Sechler et al., 1998).

ECM content is increased in all types of hepatic fibrosis. Collagen type I is the main component of scars in fibrotic liver (Brenner et al., 2000). Metalloproteinases and their inhibitors may contribute to the progression or regression of liver fibrosis (Arthur 2000). Collagen type I may be an important agent influencing the behavior of fibroblastic cells in this organ. HSC spread on polystyrene surface and show well-developed stress fibres. However, when they are cultured in type I collagen gel, their bodies become slender and they extend long cytoplasmic processes (Kojima et al., 1998).

The expression of ECM components by the cells is also subject to changes. Type I collagen expression in primary skin fibroblasts is downregulated while the expression of collagenase is increased when the cells are embedded in 3D collagen gel (Langholz et al., 1995). Downregulation of collagen expression in HSC cultured in collagen gel is accompanied by increased expression of metalloproteinases MMP-3, -13 and -14 (Takahara et al., 2003).

Fibrin deposits are found in the liver after various types of damage (Neubauer et al., 1995, Luyendyk et al., 2004). Cultivation of cells in fibrin gels changes the expression of type I collagen and other matrix proteins as shown for smooth muscle cells or keloid fibroblasts (Ross et al., 2003, Tuan et al., 2003).

Threedimensional protein lattice resembles natural cell environment more closely than hard plastic surface. This study was designed to examine how the 3D environment affects rat liver MFB which was not yet done before. The cells were obtained by repeated passaging of the nonparenchymal liver cell fraction and they were embedded in fibrin or collagen type I sandwich gels. We have found out that MFB phenotype changes greatly in collagen gels.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (Anlab, Prague, Czech Republic) were fed commercial pelleted diet ad libitum and were maintained in an air-conditioned room at 22 °C. They were used when they weighed 450-550 g. The experiments were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Kralove.

2.2. Cell isolation and culture

Liver was perfused in situ through the portal vein with Ca²⁺-free Hanks balanced salt solution (Gibco HBSS; Invitrogen, Grand Island, U.S.A.) for 10 min., followed by 100 mL of 0.2% pronase E (w/v) (Roche, Prague) solution and by 250 mL of 0.01% collagenase B (Roche). The enzymes were dissolved in complete HBSS and the temperature of the perfusion

solution was maintained at 38 °C. The cell suspension was incubated in 0.001% DNase (Roche) for 30 min. HSC fraction of liver cells was isolated by centrifugation on Optiprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) gradient as described before (Jiroutova et al. 2007). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma, Prague) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA, Cölbe, Germany), 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Sigma). Myofibroblasts were obtained after 4 passages of the culture. The numbers of cells used are given in Figures and Tables.

2.3. Collagen gels

A modified procedure of Elsdale and Bard (1972) was used to prepare collagen. Rat tail tendons were cut to small pieces, extracted with 0.15 M NaCl overnight and then with 0.25 M acetic acid for 48 hrs with continuous stirring. The suspension was dialyzed against three exchanges of cold 0.02 M acetic acid and centrifuged at 16,000 g for 40 min. All these manipulations were done at 4 °C. Collagen concentration was adjusted to 1.33 mg/mL. Filter-sterilized collagen solution was mixed with 4 x DMEM in the ratio 3:1 (v/v) and 1.6 mL aliquots were pipetted immediately into Petri dishes 35 mm in diameter. The gels were allowed to polymerize in the CO₂ incubator for 1 hour at 37 °C and then they were overlaid with the same volume of DMEM containing 20% FBS and antibiotics. MFB suspended in the culture medium were pipetted on each gel on the following day and allowed to attach overnight. They were overlaid with another layer of collagen (0.4 mL). The medium on the gels was exchanged daily.

2.4. Fibrin gels

Bovine plasma fibrinogen (Calbiochem Merck, Prague) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.41 at the concentration of 1 mg clottable protein/mL, sterilized by filtration and aliquots of 1.6 mL were pipetted into 35 mm Petri dishes. Bovine plasma thrombin (Sigma) was added (6.6×10^{-2} U/mL fibrinogen solution). After 1 hour in the CO₂ incubator the gels were overlaid with the same volume of 2 x DMEM containing 20% FBS and left overnight. MFB suspension was pipetted on top. For RNA analysis, the cells were overlaid with 0.4 mL of fibrin gel on the following day. The medium on the gels was exchanged daily.

2.5. Immunocytochemistry

The cells were fixed in cold acetone after 1 to 7 days in culture. Portions of collagen and fibrin gels were removed from the dishes before fixation. The cells were permeabilized with Triton X-100 and preincubated with 1% FBS for 1 hour. They were stained with a monoclonal antibody against α -smooth muscle actin (α -SMA), clone 1A4, (Sigma), dilution 1:400, or with polyclonal rabbit antibodies against MMP-2 and MMP-13 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1:100. The incubation was done at 4 °C for 2 hours. The secondary antibody was Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG or FITC-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Europe, Newmarket, United Kingdom). The slides were mounted in polyvinyl alcohol mounting medium (Sigma) and examined by fluorescence microscopy.

2.6. Gel digestion

Petri dishes, 35 mm in diameter, were pre-weighed. MFB were plated on plastic or on 1.8 mL of fibrin or collagen gel. Control dishes were incubated without cells. After 7 days of incubation, the dishes were washed with PBS, dried at 80 °C and weighed.

2.7. Western blot analysis

The cells were scraped from the plastic, suspended in phosphate buffered saline (PBS) containing 4 mM EDTA and washed 4fold by this solution. Collagen gel was dissolved by *Clostridium histolyticum* collagenase Type VII that was chromatographically purified by the producer (Sigma). The cells were washed 4fold with EDTA-containing PBS. The proteins were extracted with cell lysis buffer (Cell Signaling, Danvers, USA). Protein content was determined with bicinchoninic acid (Sigma). Five or 10 µg protein were applied on Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen Life Technologies, Prague, Czech Republic) under nonreducing conditions. The proteins were transferred to 0.2 µm Hybond nitrocellulose membrane (GE Healthcare, München, Germany). The antibodies used were rabbit antiMMP-2 (H-76, Santa Cruz), rabbit antiMMP-3 (ab 53015, Abcam, Cambridge, United Kingdom), rabbit antiMMP-9 (H-129, Santa Cruz), rabbit antiMMP-13 (H-230, Santa Cruz), mouse anti- α -SMA (1A4, Sigma), mouse anti β -actin (AC-74, Sigma), mouse antiGAPDH (6C5, Abcam) and rabbit anticytochrome c (ab 18817, Abcam). The membranes were incubated with the antibodies at 4°C overnight. The secondary antibodies were from Santa Cruz. Detection was done with Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz).

2.8. RNA isolation and reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-rtPCR)

The gels were centrifuged at 12,000 g for 5 minutes and then they were dissolved in lysis buffer containing mercaptoethanol (Qiagen, Hilde, Germany). Total cellular RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA was reverse transcribed using cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Prague) and quantified with TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). The results were normalized to 18S RNA expression.

2.8. Statistical analysis

One sample t-test or Wilcoxon-Signed-Rank test was used to evaluate statistical significance of the results. The significance level was $p = 0.05$.

3. Results

3.1. Cell morphology and immunofluorescence

MFB cultured on plastic substrates under standard conditions were spread with prominent stress fibers staining for alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (Fig. 1a, 2a). The cells on collagen gel were small but still staining for actin. They extended short processes and had a tendency to aggregate into star-shaped clusters (Fig. 1c, 2c). MFB cultured in or on fibrin gels were distributed more evenly (Fig. 2b). The cells growing on fibrin gel were also smaller in size than the cells on plastic, they were elongated with long processes and contained visible stress fibers closer to one another (Fig. 1b). For technical reasons, the cell studied by morphological methods were plated on the gels. Comparable results with the cells embedded in the gels were found (not shown).

When MFB were cultured on collagen gels for 1 week, they solubilized 51% of the substrate, while only 15% of fibrin gel was degraded (Fig. 3). The cells on plastic were negative when stained for metalloproteinases 2 and 13 (Fig. 1 d,g). The cells cultured on fibrin gel showed very slight positivity for MMP-13 (Fig. 2 e,h). More pronounced staining for MMP-13 was found in MFB on collagen gel (Fig. 2 f,i). Discernible foci of MMP-2 were observed in MFB cultured on both gels suggesting formation of secretory granules.

3.2. Western blot analysis

Representative blots are shown in Fig. 4. The changes in the cytoskeleton were not limited to the morphology of stress fibres; α -SMA and β -actin levels were lower in the cells embedded in collagen, the decrease in β -actin being much more pronounced. The expression of

the key enzyme of glycolysis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), was higher in the cells in collagen while that of mitochondrial protein cytochrome c was lower. The difference in the MMP-13 (collagenase 3) expression between plastic and gel on protein level corresponded to that found by immunocytochemistry and by mRNA determination. No difference was found in the expression of MMP-3 (stromelysin 1). Protein levels of MMP-2 and MMP-9 (gelatinases A and B, respectively) were lower in the cells cultured in the gel. The bands corresponding to the proforms and activated forms of gelatinases were detected.

3.3. Reverse transcription real-time polymerase chain reaction

RT-rtPCR analyses were focused on the determination of individual MMPs, their substrates and inhibitors and of cytokines that may play a role in the regulation of gene expression.

The results of the analyses are summarized in Table 1. Collagen gel stimulated the expression of a group of MMPs, although to different degrees. The greatest increase was found in MMP-13. The mRNA level of MMP-13 in the cells cultured on a plastic substrate was hardly detectable and thus the percentage difference from the cells in the gel was more than fortyfold. MMP-3 was also stimulated but the variability of the stimulation was high and the result was not significant. MMP-2 and -9 showed a mild increase. The expression of membrane-bound MMP-14 (MT1-MMP) was increased threefold.

The expression of tissue inhibitors of MMP (TIMP-1 and -2) did not change after cultivation of MFB in collagen gel. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) mRNA level decreased to one third. The expression of collagenase substrates, collagen types I and XII, did not change or decreased, respectively. The expression of the gelatinase substrate, collagen type IV, did not change. The expression of the ubiquitous extracellular ECM protein, osteopontin, increased twofold. Thrombospondin 2 is a member of thrombospondin family and plays a role in the attachment of cells to matrix proteins (Yang et al. 2000). Its expression in MFB decreased to about one half.

Significant shifts in the expression of cytokines were found in MFB cultured in collagen gels. TGF- β 1 expression increased about twofold while that of TGF- β 2 and TGF- β 3 dropped to less than one quarter. Connective tissue growth factor (CTGF) and interleukin-6 (IL-6) expression decreased to about one half of the values on plastic. The expression of β -catenin, the nuclear protein that reflects the development of HSC into myofibroblastic cells (Kordes et al., 2008), remained constant during the experiments with gels.

Fibrin caused much smaller increases in MMP expression (Table 1). The expression of MMP-13 did not change at all, the expression of MMP-9 changed in an opposite direction when compared to the effect of collagen gel. Collagens were not affected and osteopontin expression was decreased in fibrin. Changes in cytokine expression were not significant, only that of TGF- β 3 decreased to one half.

4. Discussion

Cells surrounded by ECM components in 3D cultures respond both to chemical composition and mechanical stiffness of the environment. Biochemical and mechanical stimuli lead to changes in cell phenotype and to subsequent remodelling of the matrix (Stegemann et al., 2005). Cell cytoskeleton plays an important role in the transmission of the ECM signals (Unemori and Werb, 1986).

Liver MFB have not yet been studied in 3D cultures. Fibrin and collagen sandwich gels were used in this study to examine their behaviour. MFB cultured on polystyrene dishes were large and spread, possibly in an effort to endocytose the dish as a foreign body. After they were transferred to collagen gel they decreased in size and turned slender with short processes. Myofibroblastic cells isolated from human liver and transferred to type I collagen gel after 5-10 passages had a similar shape (Li et al., 1999). HSC respond differently when embedded in

collagen gel; they acquire a polygonal shape with long processes, reminiscent of HSC in vivo that possess long processes encircling liver sinusoids (Kojima et al., 1998, Li et al., 2001). MFB formed clusters in collagen in a similar way as HSC (Senoo et al., 1996).

Prolonged cultivation of MFBs in collagen decreased the expression of both α -SMA and β -actin. Actin isoforms perform distinct functions in the cells, α -actin is responsible for contractile activity of the cells, β -actin is involved in cell spreading (Khaitlina, 2007). The expression of α -SMA is greatly influenced by the rigidity of the substrate; it is higher on collagen-coated plastic than on collagen-coated polyacrylamide gel as shown in human trabecular cells (Schlunck et al., 2008). The composition of the matrix is also important. Plating human dermal fibroblasts on collagen inhibits α -SMA synthesis (Ehrlich et al., 2006). The expression of β -actin in rat hepatocytes depends on the composition of surrounding ECM. (Otsu et al., 2001, Pruksakorn et al., 2010).

Also the energy metabolism of MFBs may have been changed as suggested by the relative increase in GAPDH protein and a decrease in cytochrome c. Collagen matrix is likely to decrease the diffusion of oxygen while its consumption by proliferating cells increases. HepG2 cells cultured in 3D scaffold composed mainly of collagen I respond to this disproportion by increased expression of enzymes involved in glycolysis and decreased expression of mitochondrial proteins (Pruksakorn et al., 2010). Besides glycolysis and oxidative phosphorylation, respectively, both GAPDH and cytochrome c have important functions in cell proliferation and in programmed cell death (Barbini et al., 2007, Rytömaa et al., 2000).

It has been shown that the reorganization of actin cytoskeleton associated with changes in the cell shape leads to the induction of collagenase in rabbit synovial fibroblasts (Kheradmad et al., 1998, Unemori et al., 1986). The transfer of liver MFBs into collagen sandwich induced a change in the expression of a group of proteinases. The expression of MMP-13 in the cells cultured on plastic was negligible and its increase after transferring the cells into the gel was dramatic both on mRNA and protein level. The stimulation was specific of collagen, fibrin had little effect. mRNA levels of gelatinases MMP-2 and MMP-9 showed a mild increase in collagen gel but Western blotting analysis suggested that the secretion of these enzymes into the medium might prevail. Immunocytochemistry detected MMPs in the cells cultured on the gels but these results may have been influenced by the great changes in the size and shape of MFB. Relocalization of MMP-2 to discernible granules was observed. It may reflect concentrating the protein in MFB on the gels rather than changes in the amount of protein per cell.

Each of the proteinases MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-13 has a broad spectrum of substrates. The proteinases are able to degrade native and denatured collagen molecules, glycoproteins, proteoglycan core proteins and metalloproteinase proenzymes (Somerville et al., 2003). MMP-14 whose expression increased after transferring MFB to collagen is known to participate in MMP-2 activation and in cell migration (Hernandez-Barrantes et al., 2000, Even-Ram and Yamada, 2005). The changes in metalloproteinase mRNA levels found in MFB embedded in collagen resemble those described for HSC (Takahara et al., 2003). The expression of MMP inhibitors TIMP-1 and -2 was unchanged in MFB but the expression of PAI-1 was decreased significantly. In addition to the transcriptional regulation, MMP activity may be partly regulated on the level of proenzyme activation.

Various metalloproteinases are required for cell migration. Both proteolytic and non-proteolytic mechanisms may be utilized (Even-Ram and Yamada, 2005). The propeller-like domains in their molecules may facilitate cellular movement (Dufour et al., 2008). The expression of active MMPs that are able to digest collagenous matrix, as was shown in this study, and the cell shape changes suggest that MFB may be able to migrate under in vivo conditions. However, collagenous matrix in liver may be more difficult to overcome because of collagen crosslinking that was not present in this ECM model.

PAI-1 inhibits plasmin activator and the conversion of plasminogen to active plasmin, a protease with broad specificity. It may serve to maintain the integrity of ECM. Collagen I suppresses PAI-1 mRNA upregulation in keratinocytes (Jones et al., 2002). The expression of PAI-1 in MFB in collagen gels was decreased to one third.

The increase in the degradative properties of MFB was accompanied by changes in the expression of some ECM proteins on mRNA level in this study. The expression of fibrillar type I collagen and of net-forming type IV collagen was not affected by collagen gel. The expression of type XII collagen belonging to the FACIT group of collagens that adhere to the surface of collagen fibrils was decreased. This contrasts with the behaviour of human skin fibroblasts (Langholz et al. 1995).

Osteopontin is a phosphorylated acidic glycoprotein interacting with cell integrins via the RGD sequence. It is important in the migration of arterial smooth muscle cells (Jalvy et al., 2007). Osteopontin expression increases in liver fibrogenesis (Lorena et al., 2006) and it was increased in MFB transferred to collagen gel. Thrombospondin 2 binds to MMP-2 and inhibits its activity (Yang et al., 2000). Thrombospondin 2 expression was decreased in MFB after transfer to collagen.

IL-6 is a cytokine that stimulates collagen synthesis in vivo when injected into rats (Choi et al., 1994). Its expression in human skin fibroblasts was high in 3D collagen gel when compared to a monolayer on plastic substrate (Eckes et al., 1992). However, in liver MFB, IL-6 expression decreased after transferring the cells into collagen gel.

TGF- β 1 is known to stimulate ECM production and inhibit cell proliferation in liver and in other tissues (Gressner et al., 2002). It modulates the expression of collagen I and collagenase MMP-13 mRNA expression in HSC in a reciprocal manner (Lechuga et al., 2004). In contrast, TGF- β 2 attenuates fibrosis in some animal models (Hill et al., 2001). TGF- β 3 is expressed in cutaneous wounds but it is differently regulated than TGF- β 1 and TGF- β 2 and reduces scarring (Frank et al., 1996). The transfer of MFB into collagen gel caused shifts in the expression of TGF- β isoforms, namely, the ratio of TGF- β 1 to TGF- β 2 or TGF- β 3. The relationship of these changes to the modification of the expression of ECM components is not clear. Moreover, it was shown in fibroblasts that 3D collagen lattice may modulate the effect of TGF- β on cells (Cousty et al., 1990).

CTGF, a member of CCN gene family, is overexpressed in fibrotic liver as well as in HSC. In some cells, e.g. in hepatocytes, but not in HSC, its expression is induced by TGF- β 1 (Gressner et al., 2007). The expression of CTGF in human lung fibroblasts is supported by increasing stiffness of the environment (Schild and Trueb, 2004). In MFB, the CTGF expression decreased in collagen gel.

Cell migration plays an important role in the formation of liver fibrotic septa (Carloni et al., 1997, Li et al., 2009). This study shows that the behaviour of MFB in 3D environment differs from that on commonly used plastic substrates. When liver MFB were transferred to sandwich-type collagen gel, they acquired a shape that may facilitate migration and they digested surrounding gel. The changes in size and shape were accompanied by the rearrangement of the cytoskeleton. The reciprocal changes in the expression of GAPDH and cytochrome c suggest a shift to anaerobic glycolysis. The expression and probably the secretion of a group of metalloproteinases able to degrade various components of ECM was increased in the cells transferred to collagen. Modulation by collagen was rather specific as the changes caused by fibrin gel were much less prominent. Significant shifts in the expression of a number of profibrotic cytokines and of proteins important in ECM remodelling may be related to the regulation of the phenotype change of MFB.

References

Arthur M.J.P., 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver

- fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastroent. Liver Physiol.* 279, G245-G249.
- Barbini, L., Rodriguez, J., Dominguez, F., Vega, F., 2007. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase exerts different biologic activities in apoptotic and proliferating hepatocytes according to its subcellular localization. *Mol. Cell. Biochem.* 300, 19-28.
- Brenner, D.A., Waterboer, T., Choi, S.K., Lindquist, J.N., Stefanovic, B., Burchardt, E., Yamauchi, M., Gillan, A., Rippe, R.A., 2000. New aspects of hepatic fibrosis. *J. Hepatol.* 32 (Suppl. 1), 32-38.
- Carloni, V., Romanelli, R.G., Pinzani, M., Laffi, G., Gentilini, P., 1997. Focal adhesion kinase and phospholipase C γ involvement in adhesion and migration of human hepatic stellate cell. *Gastroenterology* 112, 522-531.
- Choi, I., Kang, H.-S., Yang, Y., Pyun, K.-H., 1994. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 95, 530-535.
- Coustry, F., Gillery, P., Maquart, F.-X., Borel, J.-P., 1990. Effect of transforming growth factor β on fibroblasts in three dimensional lattice cultures. *FEBS Lett.* 262, 339-341.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., Yamada, K.M., 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294, 1708-1712.
- Dufour, A., Sampson, N.S., Zucker, S., Cao, J., 2008. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J. Cell. Physiol.* 217, 643-651.
- Eckes, B., Hunzelmann, N., Ziegler-Heitbrock, H.-W.L., Urbanski, A., Luger, T., Krieg, T., Mauch, C., 1992. Interleukin-6 expression by fibroblasts grown in three-dimensional gel cultures. *FEBS Lett.* 298: 229-232.
- Ehrlich, H.P., Allison, G.M., Leggett, M., 2006. The myofibroblast, cadherin, α smooth muscle action and the collagen effect. *Cell Biochem. Funct.* 24: 63-70.
- Elsdale T, Bard J., 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* 54, 626-637.
- Even-Ram, S., Yamada, K.M., 2005. Cell migration in 3D matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 524-532.
- Frank, S., Madlener, M., Werner, S., 1996. Transforming growth factors β 1, β 2, and β 3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 271, 10188-10193.
- Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S., 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front. Biosci.* 7, 793-807.
- Gressner, O.A., Lahme, B., Demirci, I., Gressner, A.M., Weiskirchen, R., 2007. Differential effects of TGF- β on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J. Hepatol.* 47: 699-710.
- Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Desmouliere, A., 2006. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 135-151.
- Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M.M., Yurkova, M., Gervasi, D.C., Raz, Y., Sang, Q.A., Fridman, R., 2000. Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 275: 12080-12089.
- Hill, C., Flyvbjerg, A., Rasch, R., Bak, M., Logan, A., (2001). Transforming growth factor- β 2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. *J. Endocrinol.* 170, 647-651.
- Jalvy, S., Renault, M.-A., Leen, L.L.S., Belloc, I., Bonnet, J., Gadeau, A.-P., Desgranges, C., 2007. Autocrine expression of osteopontin contributes to PDGF-mediated arterial smooth muscle cell migration. *Cardiovasc. Res.* 75, 738-747.

- Jiroutova, A., Slavkovsky, R., Cermakova, M., Majdiakova, L., Hanovcova, I., Bolehovska, R., Hajzlerova, M., Radilova, H., Ruzsova, E., Kanta, J., 2007. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 58: 263-273.
- Jones, J.M., Cohen, R.L., Chambers, D.A., 2002. Collagen modulates gene activation of plasminogen activator system molecules. *Exp. Cell Res.* 280: 244-254.
- Khaitlina, S.Yu., 2007. Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Cell Tissue Biol.* 1: 293-304.
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., Werb, Z., 1998. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280, 898-902.
- Kinnman, N., Housset, C., 2002. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front. Biosci.* 7, 496-503.
- Knittel, T., Kobold, D., Piscaglia, F., Saile, B., Neubauer, K., Mehde, M., Timpl, R., Ramadori, G., 1999a. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem. Cell Biol.* 112, 387-401.
- Knittel, T., Kobold, D., Saile, B., Grundmann, A., Neubauer, K., Piscaglia, F., Ramadori, G., 1999b. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117, 1205-1221.
- Kojima, N., Sato, M., Imai, K., Miura, M., Matano, Y., Senoo, H., 1998. Hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) change their cytoskeleton structure by extracellular matrix components through a signal transduction system. *Histochem. Cell Biol.* 110, 121-128.
- Kordes, C., Sawitzka, I., Häussinger, D., 2008. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 116-123.
- Langholz, O., Röckel, D., Mauch, C., Kozłowska, E., Bank, I., Krieg, T., Eckes, B., 1995. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *J. Cell Biol.* 131, 1903-1915.
- Lechuga, C.G., Hernandez-Nazara, Z.H., Dominguez Rosales, J.-A., Morris, E.R., Rincon, A.R., Rivas-Estilla, A.M., Esteban-Gamboa, A., Rojkind, M., 2004. TGF- $\beta 1$ modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p3MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70^{S6K}. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* 287, G974-G987.
- Li, Y.-L., Sato, M., Kojima, N., Miura, M., Senoo, H., 1999. Regulatory role of extracellular matrix components in expression of matrix metalloproteinases in cultured hepatic stellate cells. *Cell Struct. Funct.* 24, 255-261.
- Li, D., Friedman, S.L., 2001. Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. In: Arias I.M., Boyer J.L., Chisari F.V., Fausto, N., Schachter, D.A., Shafritz, D.A., eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 455-468.
- Li, C., Kong, Y., Wang, H., Wang, S., Yu, H., Liu, X., Yang, X., Jiang, X., Li, L., Li, L., 2009. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *J. Hepatol.* 50, 1174-1183.
- Lorena, D., Darby, I.A., Gadeau, A.-P., Leen, L.L.S., Rittling, S., Porto, L.C., Rosenbaum, J., Desmouliere, A., 2006. Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. Altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J. Hepatol.* 44, 383-390.
- Luyendyk, J.P., Maddox, J.F., Green, C.D., Ganey, P.E., Roth, R.A., 2004. Role of

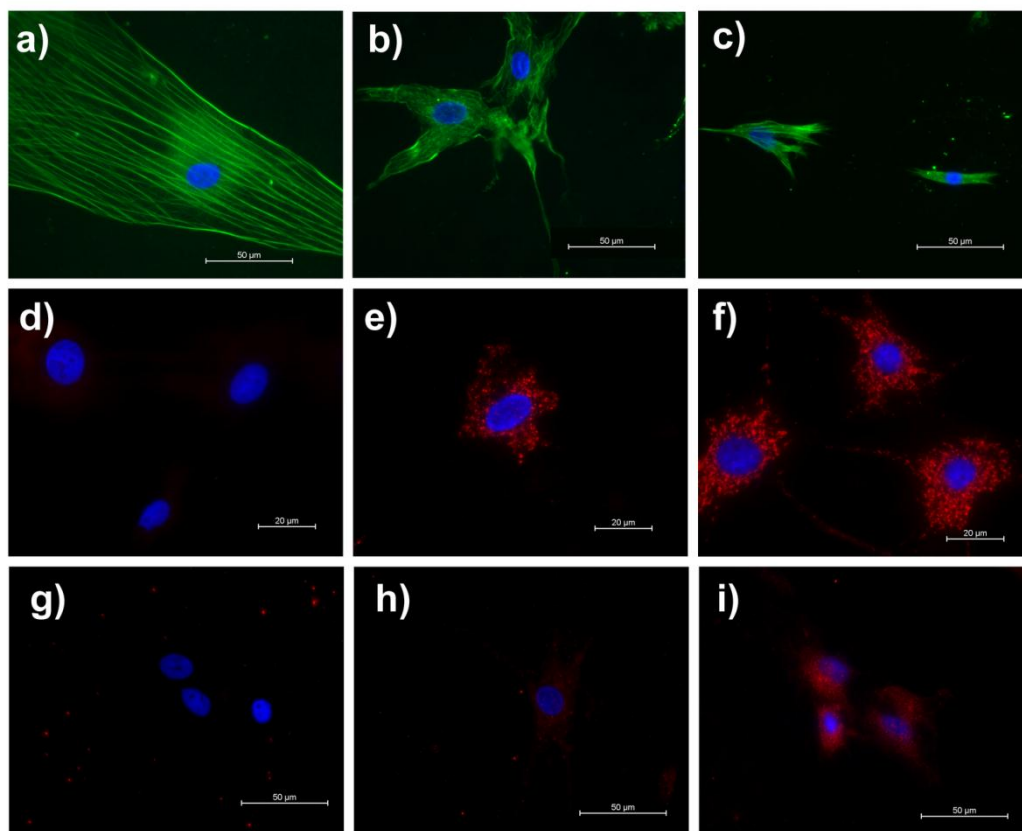
- hepatic fibrin idiosyncrasy-like liver injury from lipopolysaccharide-ranitidine coexposure in rats. *Hepatology* 40, 1342-1351.
- Neubauer, K., Knittel, T., Armbrust, T., Ramadori, G., 1995. Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury. *Gastroenterology* 108, 1124-1135.
- Otsu, K., Ito, K., Kuzumaki, T., Iuchi, Y., 2001. Differential regulation of liver-specific and ubiquitously-expressed genes in primary rat hepatocytes by the extracellular matrix. *Cell Physiol. Biochem.* 11, 33-40.
- Parola, M., Marra, F., Pinzani, M., 2008. Myofibroblast – like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol. Aspects Med.* 29, 58-66.
- Pinzani, M., Gentilini, P., 1999. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* 19, 397-410.
- Pruksakorn, D., Lirdprapamongkol, K., Chokchaichamnankit, D., Subhasitanont, P., Chiablaem, K., Svasti, J., Srisomsap, C., 2010. Metabolic alteration of HepG2 in scaffold-based 3-D culture: proteomic approach. *Proteomics* 10, 3896-3904.
- Ross, J.J., Tranquillo, R.T., 2003. ECM gene expression correlates with in vitro tissue growth and development in fibrin gel remodeled by neonatal smooth muscle cells. *Matrix Biol.* 22, 477-490.
- Rytömaa, M., Lehmann, K., Downward, J., 2000. Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria; inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* 19: 4461-4468.
- Schild, C., Trueb, B., 2004. Three members of the connective tissue growth family CCN are differentially regulated by mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1691, 33-40.
- Schlunck, G., Han, H., Wecker, T., Kampik, D., Meyer-ter-Vehn, T., Grehn, F., 2008,. Substrate rigidity modulates cell-matrix interactions and protein expression in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 262-269.
- Sechler, J.L., Corbett, S.A., Wenk, M.B., Schwarzbauer, J.E., 1998. Modulation of cell-extracellular matrix interactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 857, 143-154.
- Senoo, H., Imai, K., Sato, M., Kojima, N., Miura, M., Hata, R.-I., 1996. Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol. Int.* 20, 501-512.
- Somerville, R.P.T., Oblander, S.A., Apte, S.S., 2003. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol.* 4, 216-226.
- Stegemann, J.P., Hong, H., Nerem, R.M. 2005. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J. Appl. Physiol.* 98, 2321-2327.
- Takahara, T., Zhang, L.P., Yata, Y., Xue, F., Minemura, M., Sato, H., Watanabe, A., 2003. Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: its activation and signaling pathway. *Hepatol. Res.* 26: 318-326.
- Tuan, T.-L., Wu, H., Huang, E.Y., Chong, S.S.N., Laug, W., Messadi, D., Kelly, P., Le, A., 2003. Increased plasminogen activator inhibitor-1 in keloid fibroblasts may account for their elevated collagen accumulation in fibrin gel cultures. *Am. J. Pathol.* 162, 1579-1589.
- Unemori, E.N., Werb, Z., 1986. Reorganization of polymerized actin: a possible trigger

for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels. *J. Cell Biol.* 103, 1021-1031.

Yang, Z., Kyriakides, T.R., Bornstein, P., 2000. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol. Biol. Cell* 11, 3353-3364.

Figures and Table

Fig. 1. Immunofluorescence of MMP. MFB were cultured for 7 days on plastic (a, d, g) on fibrin gel (b, e, h) or on type I collagen gel (c, f, i). They were stained with antibodies against α -SMA (a, b, c), MMP-2 (d, e, f) and MMP-13 (g, h, i) The antigens were visualized by immunofluorescence. The cell numbers were 0.05 million/per 35 mm Petri dish.



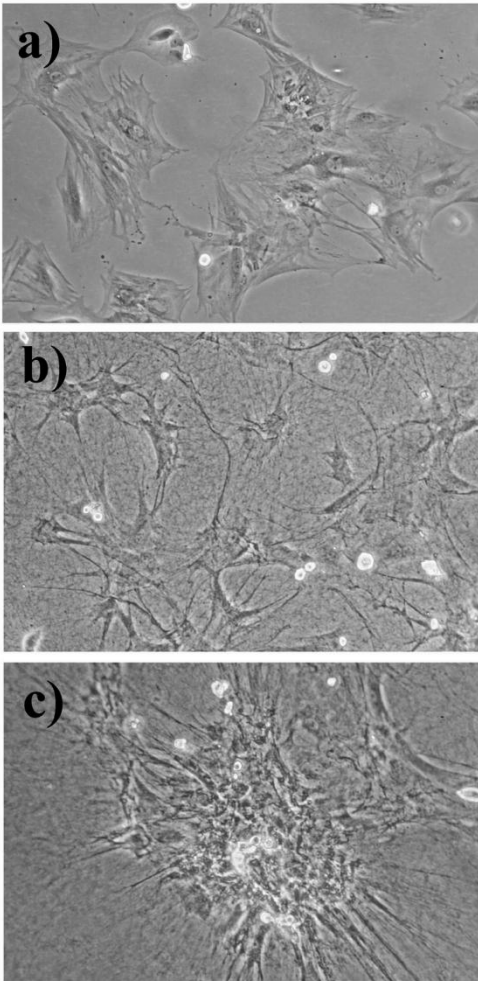


Fig. 2. MFB in phase contrast. MFB 24 hours after plating on plastic (a), fibrin gel (b) or type I collagen gel (c). Cell numbers were 0.8 million/100 mm Petri dish, 0.25 million/1.8 mL fibrin gel in 35 mm Petri dish and 0.2 million/2.4 mL collagen gel in 35 mm Petri dish.

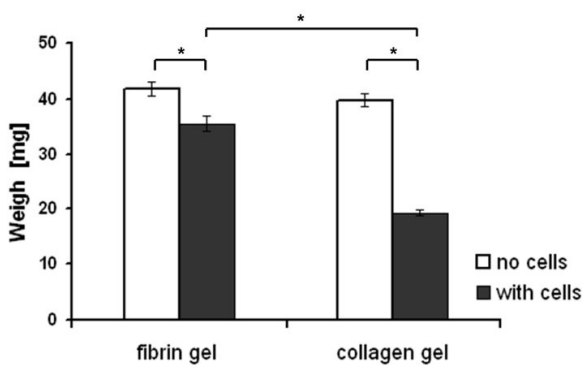


Fig. 3. Fibrin and collagen gel digestion by MFB. Petri dishes were preweighed. MFB (0.3 million cells) were plated on plastic or on 1.8 mL of fibrin or collagen gel. Seven days after plating the dishes were washed with PBS and dried at 80°C. Control dishes were incubated without cells. The weights of the dried gels are shown. Means ± S.E.M. (n= 8) are given. Asterisks denote statistically significant results (p < 0.05).

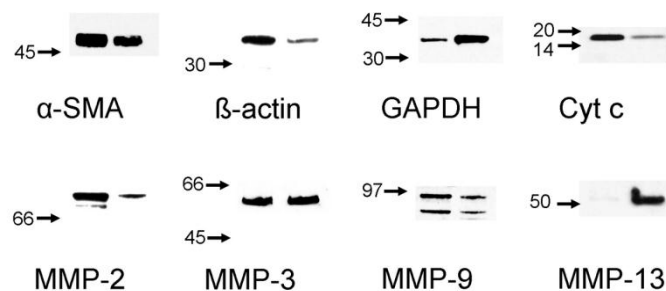


Fig. 4. The lysates of cells cultured on plastic substrate (left lanes) or in collagen gel (right lanes) were subjected to Western blotting under non-reducing conditions. Molecular weights in kDa are indicated. GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cyt c- cytochrome c.

	Gene abbreviation Gene name	Accession number	Fibrin gel	Collagen gel
Metalloproteinases and inhibitors	MMP-2 Gelatinase A	NM_031054	92 ± 21	167 ± 11 ^{ab}
	MMP-3 Stromelysin-1	NM_133523	579 ± 271	1772 ± 1333
	MMP-7 Matrilysin	NM_012864	51 ± 17 ^a	87 ± 23
	MMP-9 Gelatinase B	NM_031055	20 ± 3 ^a	162 ± 65 ^b
	MMP-13 Collagenase-3	XM_343345	105 ± 49	4086 ± 3289 ^{ab}
	MMP-14 Membrane-inserted MMP	NM_031056	80 ± 12	298 ± 41 ^{ab}
	TIMP-1 Metalloproteinase inhibitor 1	NM_053819	95 ± 10	84 ± 19
	TIMP-2 Metalloproteinase inhibitor 2	NM_021989	86 ± 17	128 ± 16
	PAI-1 Serine peptidase inhibitor 1	NM_012620	67 ± 10 ^a	30 ± 5 ^{ab}
Cytokines	IL-6	NM_012589	98 ± 23	49 ± 16 ^a
	TGF beta1	NM_021578	90 ± 13	195 ± 28 ^{ab}
	TGF beta2	NM_031131	72 ± 5	22 ± 2 ^a
	TGF beta3	NM_013174	53 ± 5 ^a	22 ± 5 ^{ab}
	CTGF	NM_022266	92 ± 16	40 ± 3 ^{ab}
ECM components	COL1a2 Procollagen type I, alpha 2	NM_053356	149 ± 35	106 ± 11
	COL4a1 Procollagen type IV, alpha 1	XM_214400	101 ± 14	93 ± 21
	COL12a1 Procollagen type XII, alpha 1	XM_243912	105 ± 11	54 ± 5 ^{ab}
	TSP-2 Thrombospondin 2	XM_214778	97 ± 13	44 ± 6 ^{ab}
	SPP1 Osteopontin	NM_012881	55 ± 8 ^a	217 ± 51 ^b
Nuclear protein	CTNNB1 Catenin beta 1	NM_035357	82 ± 24	104 ± 10

Table 1. Expression of selected genes in MFB cultured in fibrin or in type I collagen gel analyzed by RT-rtPCR. MFB were cultured in fibrin or in collagen gels for 5 days. The results are shown as percentage of the expression on plastic. Cell numbers were 0.8 million/100 mm Petri dish, 0.3 million/per 2 mL fibrin gel in 35 mm Petri dish and 0.3 million per 2 mL collagen gel in 35 mm Petri dish. Statistical significance is indicated ($p < 0.05$). ^a fibrin or collagen vs. plastic, ^bcollagen vs. fibrin.

11.2. Jiroutová A, Slavkovský R, Čermáková M, Majdiaková L, Hanovcová I, Bolehovská R, Ruzová E, Kanta J.: Expression of connective tissue proteins in rat liver myofibroblasts. Exp Toxicol Pathol. 2007; 58, 263-73



Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts

Alena Jiroutová^a, Rastislav Slavkovský^{a,b}, Martina Cermaková^a, Lenka Majdiaková^a, Irena Hanovcová^c, Radka Bolehovská^{d,e}, Milena Hajzlerová^a, Hana Radilová^f, Ema Ruzsova^b, Jiri Kanta^{a,*}

^aCharles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Department of Medical Biochemistry, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

^bCPN, 561 02 Dolni Dobrouc, Czech Republic

^cCharles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Department of Clinical Microbiology, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^dCharles University in Prague, Faculty Hospital in Hradec Kralove, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^eFaculty of Medicine in Hradec Kralove, Department of Physiology, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

^fGeneri Biotech, Machkova 587, 500 11 Hradec Kralove, Czech Republic

Received 31 December 2005; accepted 7 June 2006

Abstract

Hepatic stellate cells (HSC) and liver myofibroblasts (MFB) are two cell populations most likely responsible for the synthesis of most connective tissue components in fibrotic liver. They differ in their origin and location, and possibly in patterns of gene expression. Normal and carbon tetrachloride-cirrhotic livers from rats were used to isolate HSC. Liver was perfused with pronase and collagenase solutions, followed by centrifugation of the cell suspension on a density gradient. HSC were quiescent 2 days after plating on plastic but they became activated after another 5 days in culture. When the culture was passaged 5 times, its character changed profoundly as HSC were replaced by MFB. Microarray analysis was used to determine gene expression in quiescent HSC, activated HSC and MFB. The expression of 49 genes coding for connective tissue proteins, proteoglycans, metalloproteinases and their inhibitors, growth factors and cellular markers was determined. The pattern of gene expression changed during HSC activation and there were distinct differences between HSC and MFB. Little difference between normal cells and cells isolated from cirrhotic liver was found. © 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Hepatic stellate cells; Liver myofibroblasts; Microarray analysis; Gene expression; Connective tissue; Liver cirrhosis

Introduction

Two cellular populations, hepatic stellate cells (HSC) and portal myofibroblasts (MFB), are currently regarded as the main source of extracellular matrix components in fibrotic liver (Ramadori and Saile,

*Corresponding author. Tel.: +420 49 5816 293; fax: +420 49 5512 715.

E-mail address: kanta@lfhk.cuni.cz (J. Kanta).

2002). HSC reside in Disse spaces, and in their quiescent state they synthesize connective tissue that resembles the composition of basement membranes. HSC store large amounts of vitamin A in lipid droplets (Li and Friedman, 2001). They become activated in damaged liver, changing the spectrum and quantity of proteins (Ramadori and Saile, 2002). Liver tissue can be disrupted by perfusion with pronase and collagenase solutions. HSC can be isolated from the resulting cell suspension by density gradient centrifugation. They express glial fibrillary acidic protein (GFAP), about half of them express desmin but they are negative for immunoreactive α -smooth muscle actin (α -SMA) (Li and Friedman, 2001). After 2 days in culture HSC begin to proliferate actively, to change their morphology and to express α -SMA. They lose their positivity for GFAP. This process is usually called activation. Most of the cells isolated from cirrhotic liver are already activated on the second day in culture, they show high expression of α -SMA but they do not contain GFAP (Jiroutova et al., 2005). When the culture is passaged, HSC die of apoptosis and are replaced by proliferating portal MFB that contaminate the primary culture. After 2–3 passages, the character of the cell culture changes greatly. The cells lose desmin positivity, but most cells express fibulin-2 (Knittel et al., 1999a; Kim et al., 2005). MFB can also be obtained as a minor fraction when non-parenchymal liver cells are subjected to centrifugal elutriation (Ramadori and Saile, 2002) or they can be derived from peribiliary cell clusters (Kinman et al., 2003).

HSC and MFB differ in their origin and location in liver. In normal liver, HSC are located in the parenchyma while MFB are found in the portal tracts and in the walls of the central vein. In fibrotic liver, HSC are located within the interface of parenchyma and connective tissue septa whereas MFB are situated within the septa (Ramadori and Saile, 2002). Knittel et al. (1999a) showed that the two fibroblast populations can be distinguished by different expression of certain proteins. We have used a microarray assay to quantify mRNAs for connective tissue proteins, proteoglycans, metalloproteinases (MMP) and their inhibitors, cell receptors and cytokines. Gene expression in MFB was compared with that in quiescent and activated HSC. Prolonged carbon tetrachloride (CCl_4) treatment is associated with many changes in hepatic gene expression (Jiang et al., 2004). Therefore, cells isolated both from normal liver and from CCl_4 -cirrhotic liver were used.

Materials and methods

Animals

Male Sprague Dawley rats (Anlab, Prague, Czech Republic) weighing 300–400 g were fed commercial

pelleted diet ad libitum and maintained in an air-conditioned room at 22 °C. The experiments were approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty in Hradec Kralove. Liver cirrhosis was induced by CCl_4 administration, 1 mL/kg by gavage, twice a week. Seventeen doses of the toxin, dissolved in olive oil 1:1 (volume/volume), were given.

Cell isolation

Liver was perfused through the portal vein in situ with Ca^{2+} -free Hanks' balanced salt solution (HBSS) for 10 min, followed by 100 mL of 0.2% pronase solution and by approximately 200 mL of 0.013% collagenase solution. The enzymes were dissolved in complete HBSS and the temperature was maintained at 38 °C. The perfusion was stopped when the liver looked digested. Cirrhotic livers were perfused 3 days after the last CCl_4 dose. The cell suspension was incubated with 0.01% DNase at 37 °C for 30 min. The enzymes were from Roche, Prague, and HBSS from Invitrogen, Prague. The cells were then filtered through 42 μm nylon mesh (Silk & Progress, Moravska Chrastova, Czech Republic) and centrifuged at 400g for 7 min. Optiprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) was used to make a discontinuous centrifugation gradient as described by Graham (2002) but Gey's solution was replaced with HBSS. HBSS was added to commercial 60% Optiprep to prepare 40% working solution that was mixed with the cell suspension. Optiprep concentration was adjusted to 17%. Six milliliters of this mixture in a 15 mL test tube were overlaid with 6 mL of 11.5% Optiprep in HBSS and 2 mL of HBSS were placed on top. The tubes were centrifuged at 1400g for 17 min. All centrifugations were undertaken at 20 °C. The cells at the boundary between 11.5% Optiprep and HBSS were collected.

Cell culture and immunocytochemistry

The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum, 4 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. MFB were obtained after 5 passages of the culture (Kim et al., 2005). HSC were harvested 2 or 7 days after plating. These cells were regarded as quiescent and activated, respectively. MFB were harvested 7 days after the last passage.

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for α -smooth muscle actin (α -SMA), desmin and vimentin, as described previously (Jiroutova et al., 2005). Antibody against α -SMA, clone 1A4, (Sigma, Prague) was diluted 1:400, anti-desmin (DE-R-11) and anti-vimentin (V9) antibodies (both from Dako, Glostrup, Denmark) were diluted 1:100. All antibodies used were mouse monoclonal ones reactive against rat

proteins. The secondary antibody conjugated with horse radish peroxidase was from Dako.

³H-thymidine labelling and determination of DNA radioactivity

[methyl-³H] thymidin, specific activity 1.7Tbq/mmol, was obtained from Lacomel, Prague. The label was added to the cell medium on the third day of culture in the concentration of 37 kBq (1 μ Ci) ³H-thymidine/mL. The cells were harvested after 18 h of incubation. They were thoroughly washed with cold PBS, centrifuged and hydrolyzed in 5% HClO₄ at 70 °C for 30 min. Aliquots of the hydrolyzate were used to determine DNA content (Burton, 1956) and radioactivity.

RNA isolation and microarray analysis

Repeated chloroform phenol extraction (Chomczynski and Sacchi, 1987) was used to isolate total cellular RNA from the cells. Its integrity was checked by agarose electrophoresis and its quality by spectrophotometry at 260/280 and 260/230 nm, respectively. Seven micrograms of RNA were analyzed. RNA was reverse-transcribed and directly labeled with biotin-dUTP (Fermentas, Vilnius, Lithuania) using H Minus M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas). Labelled cDNA was purified and concentrated by passing through Microcon YM-30 columns (Millipore, Prague). Microarray chips were manufactured by Clontech, Jena, Germany, and contained ~50 bp oligonucleotide probes for 92 genes. Denatured cDNA was hybridized in array tubes at 50 °C overnight followed by incubation with streptavidin-horse radish peroxidase conjugate (Pierce, Rockford, USA). After reaction with True Blue peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, USA), the intensities of staining were determined in ATR 01 Reader (Clontech). After correction for background, the gene expression intensities were normalized with all the genes on the array. The mean expression was made equal to 1.

Reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-rtPCR)

Two micrograms of total cellular RNA were transcribed to cDNA with Multiscribe RT enzyme and random primers contained in the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). cDNAs were quantified with TaqMan Gene Expression Assays and TaqMan Universal PCR Master Mix, using the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The results were normalized to 18S RNA.

Statistical analysis

One-way analysis of variance with Fisher's LSD multiple-comparison test was used. When the assumptions of normality were not met, nonparametric Kruskal Wallis one-way ANOVA on ranks with Kruskal Wallis multiple Z-value test was used. The significance level was $p = 0.05$.

Results

Immunocytochemistry

Fig. 1 shows MFB from normal liver after 5 passages of the culture. All cells were positive for α -SMA and vimentin, but 96–100% cells were negative for desmin in different isolations. The morphology of normal cells did not differ from the morphology of cirrhotic cells (data not shown).

DNA synthesis

The results of ³H-thymidine incorporation into cellular DNA are shown in Fig. 2. Normal cells, when passaged, synthesized DNA at the same rate as the primary culture. The cells isolated from cirrhotic liver incorporated less thymidine after the first passage but DNA synthesis was accentuated later on.

Gene expression

Table 1 lists the 49 genes, out of 92 tested, that yielded a relative expression higher than 0.2 after normalization. These included connective tissue proteins, proteoglycans, MMP and their inhibitors, cellular receptors and proteins used as cell markers. Three house-keeping genes are shown. GAPDH expression varied greatly, while β -actin and 18S RNA fluctuations among groups were much smaller.

Activation of HSC by culture on plastic

The genes representative of each analyzed protein group were used to draw Figs. 3a–c. GenBank abbreviations used in Fig. 3 are listed in Table 2. Fig. 3a shows changes in selected genes expression in cultured normal HSC. The expression of each gene in quiescent HSC after 2 days in culture was plotted against the expression of the genes in cells cultured for 7 days. The genes up-regulated during culture are above the diagonal (the expression ratio is >1) and the down-regulated genes are below the diagonal (the expression ratio is <1). When the expression did not change, the symbol of the protein is situated on the diagonal.

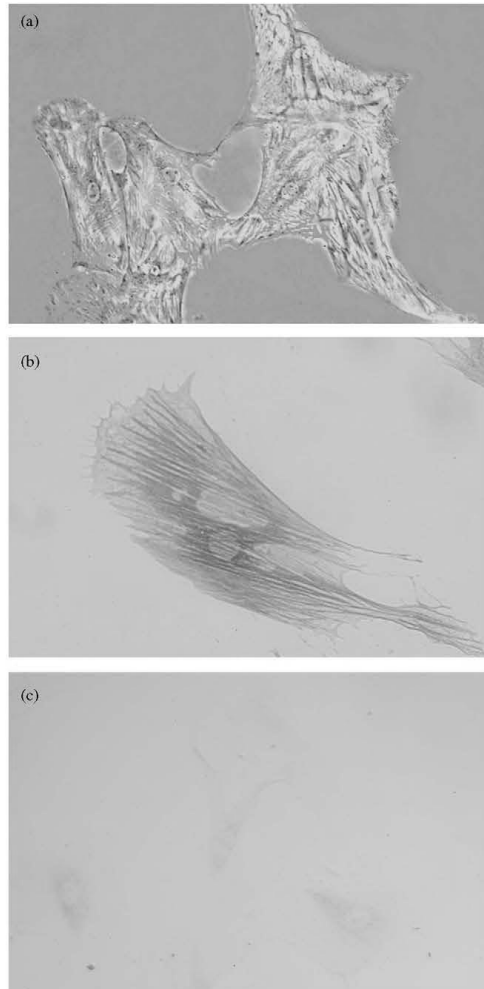


Fig. 1. Myofibroblasts isolated from normal liver: (a) phase contrast, (b) staining with anti- α -SMA antibody, (c) staining with anti-desmin antibody. Magnification: (a) $100\times$, (b,c) $200\times$.

Procollagens I, III and V showed the highest increases in expression (ratios 4.7, 4.7 and 2.9, respectively). Fibronectin expression was increased 3.3-fold, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) increased 2.8-fold. Elastin expression was low and almost did not change (1.1). The expression of fibrillin-1 decreased to 0.7. Thrombospondin-2 level was lower than that of thrombospondin-1 in HSC at 2 days but grew with time in culture (ratio 3.6) in contrast to thrombospondin-1 (0.5). Osteopontin expression increased (1.5). The

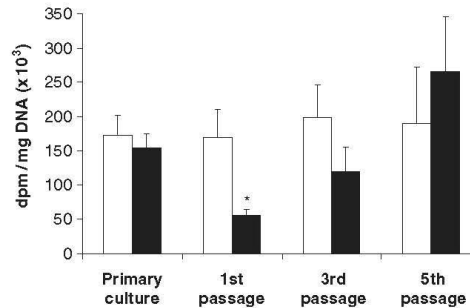


Fig. 2. DNA specific activity in primary cultures and in passaged cells. White columns indicate normal cells, black columns indicate cells from cirrhotic liver. Means \pm S.E.M. are shown. *Statistically significant result ($p < 0.05$) with respect to the primary culture.

expression of proteoglycans perlecan and biglycan increased 2.3- and 2.1-fold, respectively, but the expression ratios of syndecan-3 and -4 decreased to 0.7 and 0.5, respectively.

In contrast to connective tissue proteins, the expression of metalloproteinase MMP-9 (gelatinase B), MMP-3 (stromelysin) and MMP-13 (collagenase) decreased in the process of HSC activation to values close to zero. MMP-12 (elastase) and MMP-14 (membrane-type 1 metalloproteinase) had expression ratios of 0.7. The expressions of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-7 (matrilysin) were little affected (ratios 0.9 and 1.1, respectively). The expression of the unspecific proteinase inhibitor α -2 macroglobulin was increased 1.7-fold and the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 1.5-fold. TIMP-2 did not change.

Of the receptors tested, the greatest change was found in the expression of integrin β 3 (ratio 1.8) and of neural cell adhesion molecule, N-CAM, (2.6).

Differences between activated HSC and MFB

The two cell populations isolated from normal liver are compared in Fig. 3b. The expression of fibulin-2, a marker of MFB (Knittel et al., 1999a), was 3.7-fold higher in MFB. When compared with the starting culture, quiescent HSC, the expression of fibulin-2 was 9.5-fold higher in MFB.

The expression of most connective tissue proteins was slightly higher in MFB that of procollagens I and III (ratios 1.3), fibronectin (1.7), fibrillin-1 (1.3) and SPARC (1.4). Elastin showed a negligible difference. The expression of thrombospondins-1 and -2 was increased (ratios 3.5 and 1.7, respectively). On the other hand, osteopontin expression decreased greatly (0.1). The expression of perlecan was prominent in both cell

Table 1. Gene expression in quiescent HSC (2d), activated HSC (7d) and in liver myofibroblasts (MFB) isolated from normal (N) or cirrhotic (C) rat liver

	N-HSC 2d	C-HSC 2d	N-HSC 7d	C-HSC 7d	N-MFB	C-MFB
<i>Extracellular matrix proteins</i>						
Elastin	0.28	0.65	0.31	0.32	0.35	0.26
XM_341061	0.07	0.12	0.16	0.08	0.09	0.07
Fibrillin-1	3.82	3.75	2.64	2.66 ^b	3.43	3.95 ^f
NM_031825	0.72	0.35	0.16	0.10	0.35	0.81
Fibronectin	0.44	1.10	1.43 ^b	1.61	2.44 ^{c,d}	2.46 ^{e,f}
NM_019143	0.10	0.21	0.25	0.34	0.26	0.31
Osteopontin	1.15	1.49	1.78	1.87	0.18 ^{c,d}	0.14 ^{e,f}
NM_012881	0.31	0.33	0.49	0.41	0.11	0.03
Procollagen (I) α 2	0.52	3.01 ^a	2.45 ^b	2.83	3.25 ^{c,d}	3.67 ^f
NM_053356	0.17	0.17	0.38	0.15	0.19	0.40
Procollagen (III) α 1	0.56	2.87	2.62	2.60	3.49 ^c	4.04 ^{e,f}
XM_343563	0.09	0.28	0.47	0.17	0.16	0.12
Procollagen (IV) α 1	0.20	0.22	0.14	0.12	0.10	0.05 ^e
XM_343607	0.04	0.07	0.06	0.06	0.02	0.02
Procollagen (V) α 1	0.52	1.05 ^a	1.48 ^b	1.22	1.06 ^c	0.93
NM_134452	0.04	0.11	0.25	0.16	0.16	0.22
SPARC	0.98	2.67 ^a	2.75 ^b	2.79	3.82 ^{c,d}	4.14 ^{e,f}
NM_012656	0.18	0.18	0.35	0.23	0.26	0.13
Thrombospondin-1	2.02	1.54	1.02	1.60	3.53 ^d	3.62 ^{e,f}
AF309630	0.22	0.16	0.32	0.48	0.08	0.21
Thrombospondin-2	0.22	0.50	0.79	1.04	1.36	1.15
XM_214778	0.04	0.11	0.27	0.32	0.71	0.53
Vitronectin	0.65	0.55	0.65	0.56	0.27 ^{c,d}	0.17 ^{e,f}
NM_019156	0.12	0.15	0.14	0.15	0.05	0.05
<i>Proteoglycans</i>						
Betaglycan	1.74	1.93	1.64	1.26 ^{e,h}	1.00 ^{c,d}	0.72 ^{e,f}
NM_017256	0.21	0.08	0.09	0.12	0.11	0.09
Biglycan	0.65	1.31	1.37	1.38	1.96 ^c	1.41
NM_017087	0.05	0.18	0.38	0.39	0.34	0.30
Perlecan	1.55	4.05 ^a	3.53 ^b	4.03	4.14 ^c	4.74
XM_233606	0.27	0.38	0.68	0.90	0.35	0.58
Syndecan-1	0.57	0.43	0.46	0.35	0.34	0.26
NM_013026	0.06	0.06	0.09	0.10	0.06	0.08
Syndecan-3	1.10	0.43	0.73	0.25	0.34	0.17
NM_053893	0.44	0.17	0.29	0.12	0.11	0.03
Syndecan-4	1.32	0.57 ^a	0.62 ^b	0.43	0.35 ^c	0.25
NM_012649	0.23	0.17	0.16	0.11	0.12	0.15
<i>Metalloproteinases</i>						
MMP-2 gelatinase A	1.07	2.16 ^a	0.95	1.20 ^b	1.50	1.79
NM_031054	0.05	0.14	0.20	0.29	0.40	0.19
MMP-3 stromelysin-1	2.26	0.18	0.16	0.05	0.02 ^c	0.01
NM_133523	0.50	0.04	0.07	0.05	0.02	0.01
MMP-7 matrilysin	0.64	0.44	0.71	0.56	0.23 ^{c,d}	0.11 ^f
NM_012864	0.16	0.08	0.16	0.07	0.10	0.04
MMP-9 gelatinase B	1.11	0.00 ^a	0.05	0.01	0.01 ^c	0.00
NM_031055	0.20	0.00	0.03	0.01	0.00	0.01
MMP-12 metalloelastase	2.13	0.76 ^a	1.54	1.19	0.17 ^{c,d}	0.07 ^f
NM_053963	0.35	0.24	0.30	0.33	0.14	0.03
MMP-13 collagenase-3	2.82	0.26	0.16 ^b	0.19	0.13 ^c	0.09
XM_343345	0.68	0.07	0.07	0.08	0.05	0.03
MMP-14 MTP-1	1.33	0.68	0.94	0.81	0.88	0.41
NM_031056	0.31	0.16	0.23	0.19	0.13	0.13
<i>Proteinase inhibitors</i>						
α 2-macroglobulin	1.30	1.47	2.23	2.39	0.55 ^d	0.32 ^f
NM_012488	0.27	0.17	0.07	0.03	0.16	0.09
TIMP-1	1.53	2.40	2.33	2.22	1.97	1.57

Table 1. (continued)

	N-HSC 2d	C-HSC 2d	N-HSC 7d	C-HSC 7d	N-MFB	C-MFB
NM_053819	0.22	0.37	0.15	0.29	0.19	0.46
TIMP-2	3.72	3.47	3.82	3.80	3.12	2.93
NM_021989	0.47	0.39	0.76	0.82	0.18	0.32
<i>Cytokines</i>						
CTGF	0.39	0.50	0.39	0.72	1.77 ^{c,d}	1.38 ^e
NM_022266	0.08	0.15	0.23	0.41	0.20	0.14
FGF 2	0.26	0.20	0.30	0.25	0.15	0.06 ^f
NM_019305	0.05	0.05	0.04	0.11	0.04	0.02
IGF 1	0.60	0.34	0.54	0.28	0.15	0.05 ^e
NM_178866	0.23	0.09	0.18	0.12	0.02	0.03
IL-10	0.34	0.20 ^a	0.11 ^b	0.13	0.06 ^c	0.01 ^e
NM_012854	0.07	0.04	0.04	0.05	0.03	0.01
PDGF β chain	2.05	1.70	2.57	2.28	1.16 ^d	0.82 ^f
XM_343293	0.17	0.20	0.53	0.49	0.32	0.22
TGF- β 1	2.10	1.36	1.31	1.13	0.77 ^c	0.63
NM_021578	0.35	0.40	0.24	0.22	0.20	0.11
TGF- β 3	0.20	0.24	0.25	0.40	1.09	0.44
NM_013174	0.03	0.05	0.16	0.21	0.34	0.11
VEGF	1.49	2.29	1.35	1.43	1.36	1.71
NM_031836	0.13	0.06	0.28	0.35	0.15	0.53
<i>Receptors</i>						
Integrin α 5	2.93	3.27	2.03	2.34 ^e	3.03 ^d	3.16
XM_235707	0.44	0.21	0.12	0.18	0.39	0.37
Integrin α 6	.31	0.40	0.23	0.39	0.16	0.06 ^{e,f}
XM_215984	0.04	0.12	0.08	0.20	0.06	0.02
Integrin β 1	1.23	1.04	1.12	1.24	1.14	0.73
NM_017022	0.19	0.15	0.21	0.34	0.25	0.13
Integrin β 3	0.56	0.55	0.99	0.58	0.12 ^d	0.05 ^{e,f}
NM_153720	0.15	0.12	0.29	0.16	0.03	0.02
Laminin receptor1	1.63	2.08	1.96	1.64	1.25	1.04 ^e
NM_017138	0.32	0.30	0.21	0.29	0.09	0.17
N-CAM 1	0.76	1.12	1.96 ^b	1.75	1.44 ^{c,d}	1.24 ^f
NM_031521	0.19	0.19	0.09	0.07	0.12	0.22
<i>Cellular markers</i>						
Desmin	4.32	3.81	3.71	3.68	3.93	4.97
NM_022531	0.68	0.37	0.70	0.69	0.32	0.39
Fibulin-2	0.11	0.17	0.28	0.45	1.04 ^{c,d}	1.10 ^e
XM_232197	0.00	0.03	0.10	0.12	0.18	0.25
P100	0.45	0.67	0.80 ^b	0.66	0.49	0.46
NM_022257	0.02	0.09	0.11	0.11	0.06	0.17
Reelin	0.35	0.24	0.25	0.18	0.12 ^c	0.17
NM_080394	0.07	0.11	0.09	0.07	0.05	0.04
<i>House-keeping genes</i>						
Actin β	3.77	3.35	3.53	3.77	3.85	4.72 ^c
NM_031144	0.34	0.20	0.76	0.81	0.39	0.32
GAPDH	1.73	0.83	2.26	2.42	2.45	3.15 ^e
NM_017008.2	0.61	0.23	0.49	0.65	0.83	1.03
18S RNA	3.51	3.05	3.46	3.64	3.88	5.12 ^e
XO1117	0.38	0.35	0.78	0.94	0.32	0.49

Each result is the mean of four determinations. Means and S.E.M. are shown. Statistical significance ($p < 0.05$).

^aC-HSC 2d vs. N-HSC 2d.

^bN-HSC 7d vs. N-HSC 2d.

^cN-MFB vs. N-HSC 2d.

^dN-MFB vs. N-HSC 7d.

^eC-MFB vs. C-HSC 2d.

^fC-MFB vs. C-HSC 7d.

^gC-HSC 7d vs. C-HSC 2d.

^hC-HSC 7d vs. N-HSC 7d.

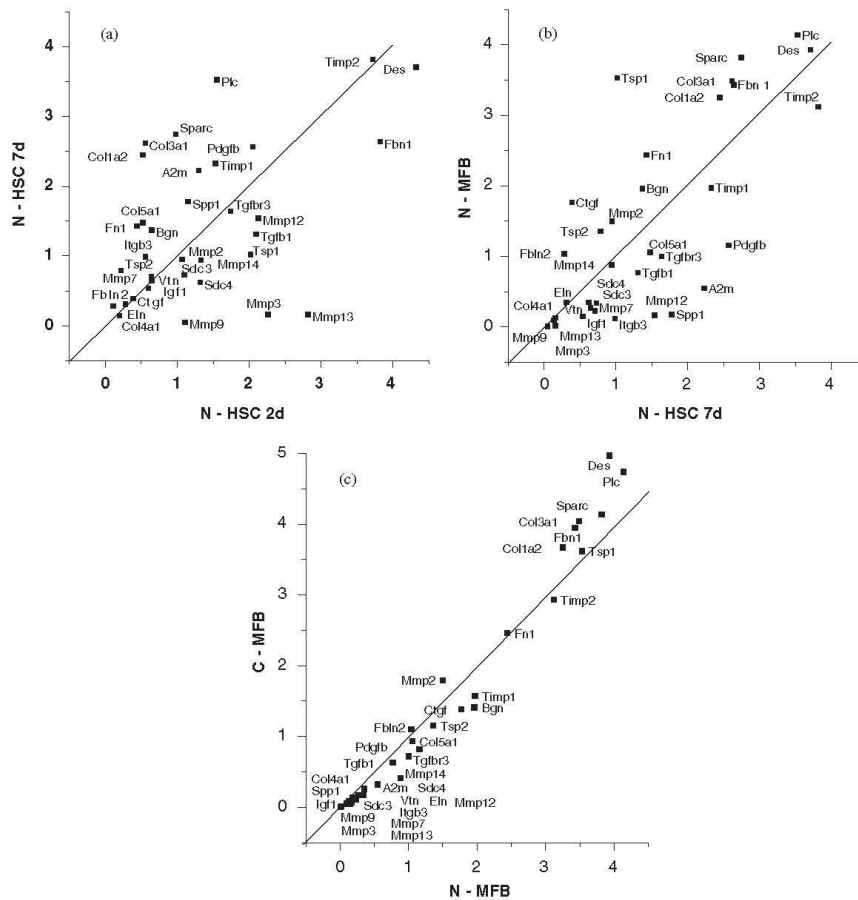


Fig. 3. (a) Changes in HSC gene expression after cultivation of the cells on plastic. (b) Comparison of gene expression in MFB and in plastic-activated HSC. (c) Comparison of gene expression in MFB cultured from normal cells and MFB from cirrhotic cells. Normal cells (N), cirrhotic cells (C). GenBank abbreviations are used (Table 2).

types (this proteoglycan is located in the top right corner of the graph), the expression of biglycan was higher in MFB (1.4). In contrast, the expression of syndecans-3 and -4 was lower (ratios 0.5 and 0.6, respectively).

The expression of MMP-9 and MMP-13 was negligible in both cell populations (the proteinases are located in the lower left corner of the graph). MMP-3 and MMP-12 were much less expressed in MFB (ratios 0.1). The expression of MMP-2 and MMP-14 (ratios 1.6 and 0.9, respectively) differed substantially from that of the other MMP. The expression of α 2-macroglobulin was much lower in MFB than in activated HSC (0.25), the expression of TIMP-1 and TIMP-2 was about the same (0.8).

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), the main profibrotic cytokine, was less expressed in MFB (ratio 0.6). On the other hand, the expression of CTGF (connective tissue growth factor) increased considerably (ratio 4.5).

There was not much difference between the cells isolated from normal liver and the cells from cirrhotic liver, when either HSC activated on plastic or MFB were compared (Table 1, Fig. 3c).

Validation of microarray results by RT-rtPCR

The expression of 4 genes was studied both by microarray analysis and by real-time PCR (Table 3).

TGF- β 1 expression was highest in quiescent HSC, less in activated HSC and lowest in MFB. CTGF showed an opposite tendency. Procollagen I expression was low in

quiescent HSC and high in activated HSC and in MFB. The increase during HSC activation was 6-fold in the microarray assay and 20-fold by the PCR assay. A wider range of cDNA concentrations can be determined by real-time PCR than by microarray analysis. Microarray assay of desmin mRNA did not detect further increase when mRNA concentrations exceeded a certain limit.

Table 2. GenBank abbreviations of proteins included in Fig. 3

A2m	Alpha-2-macroglobulin
Bgn	Biglycan
Col1a2	Procollagen, type I, alpha 2
Col3a1	Procollagen, type III, alpha 1
Col4a1	Procollagen, type IV, alpha 1
Col5a1	Procollagen, type V, alpha 1
Ctgf	Connective tissue growth factor
Des	Desmin
Eln	Elastin
Fbln2	Fibulin 2
Fbn1	Fibrillin 1
Fn1	Fibronectin 1
Igfl	Insulin-like growth factor
Itgb3	Integrin beta 3
Mmp12	Matrix metalloproteinase 12
Mmp13	Matrix metalloproteinase 13
Mmp14	Matrix metalloproteinase 14
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3
Mmp7	Matrix metalloproteinase 7
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9
Pdgfb	Platelet-derived growth factor, B polypeptide
Plc	Perlecan
Sdc3	Syndecan 3
Sdc4	Syndecan 4
Sparc	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein
Spp1	Secreted phosphoprotein 1
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
Tgfb3	Transforming growth factor, beta receptor III
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Tsp1	Thrombospondin 1
Tsp2	Thrombospondin 2
Vtn	Vitronectin

Discussion

HSC-containing fraction of liver cells underwent profound changes when the cells were passaged. As described by others (Kinnman et al., 2003; Kim et al., 2005) liver MFB were obtained after repeated passages of the primary culture. They showed a specific pattern of gene expression when compared with activated HSC in the primary culture. Sinusoidal endothelial cells that may contaminate the preparations of nonparenchymal cells express collagen types I and III and basement membrane proteins, collagen IV, laminin and entactin (Friedman et al., 1985; Neubauer et al., 1999). However, HSC are the major source of matrix components in liver. The amount of collagen synthesized by HSC is over 20-fold greater than that produced by endothelial cells per μ g of DNA (Friedman et al., 1985).

The relative expression of important connective tissue components procollagens I and III, fibronectin and SPARC increased in HSC during their activation and was also very high in MFB. All these proteins are found in high amounts in fibrotic livers (Schuppan, 1990; Frizell et al., 1995). Both HSC and MFB may thus contribute to fibrosis development in liver. The expression of thrombospondin-1 and osteopontin was different in activated HSC and in MFB. Thrombospondin-1 is a matricellular glycoprotein interacting with cellular receptors and matrix components. It is an important activator of TGF- β 1 (Chen et al., 2000; Breitkopf et al., 2005). It decreased in cultured HSC but it was

Table 3. Validation of microarray analysis by real-time RT-PCR analysis of selected genes

	MICROARRAY			PCR		
	N-HSC 2d	N-HSC 7d	N-MFB	N-HSC 2d	N-HSC 7d	N-MFB
TGF- β 1	2.00	1.41	0.93	5.15	1.76 ^a	0.69 ^b
CTGF	0.48	0.30	0.16	0.65	0.22	0.08
	0.36	0.49	1.82 ^{b,c}	4.27	3.14	8.84 ^c
Procollagen I	0.10	0.29	0.27	1.56	1.02	1.48
	0.45	2.47 ^a	3.09 ^b	1.74	35.15 ^a	18.64
Desmin	0.22	0.33	0.15	0.66	12.05	3.05
	4.40	3.29	4.01	179.12	170.03	13.53 ^{b,c}
	0.78	0.65	0.36	59.63	19.59	8.47

Three samples were analyzed both by microarrays and by RT-PCR. Samples for RT-PCR were analyzed in duplicates. The results of RT-PCR are in arbitrary units. Means and S.E.M. are shown. Statistical significance ($p < 0.05$): ^aN-HSC 7d vs. N-HSC 2d, ^bN-MFB vs. N-HSC 2d, ^cN-MFB vs. N-HSC 7d.

prominent in MFB. Osteopontin is a phosphorylated acidic glycoprotein implicated in inflammation and tissue repair (Denhardt et al., 2001). Its expression is increased in some liver diseases (Whittington et al., 2005). It was rather low in MFB when compared to both activated and quiescent HSC. Fibrillin-1 is the main component of microfibrils. Together with elastin it is present in connective tissue septa of cirrhotic liver (Dubuisson et al., 2001; Kanta et al., 2002). The expression of these proteins was not increased in either cell subpopulation. However, their deposition in tissue may be facilitated by low metalloproteinase activity. Alternatively, other cells may be responsible for increased elastin synthesis in cirrhotic liver. NFSC and CFSC are immortalized liver cell lines established by Greenwel et al. (1991). The expression of tropoelastin mRNA was by one or two orders of magnitude higher in CFSC derived from CCl₄-fibrotic rat liver than in NFSC derived from normal rat liver (Kanta and Rojkind, unpublished results).

Among the proteoglycans studied, perlecan was highly expressed both in activated HSC and in MFB. Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan whose protein core has a molecular weight 400–470 kDa, is a component of basement membranes. It can bind fibronectin and other extracellular matrix proteins and growth factors such as bFGF (Iozzo et al., 1994). In human cirrhotic liver, perlecan is abundant in fibrotic septa and coexpresses with CTGF (Ozaki et al., 2005). A novel function for perlecan in human fibroblasts was suggested by Laplante et al. (2005). A fragment of perlecan core protein inhibits apoptosis and supports myofibroblast differentiation.

In contrast to their potential substrates, the expression of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 was drastically reduced in activated HSC in agreement with the findings of Knittel et al. (1999b). The expression of these three enzymes in MFB was even smaller than that in activated HSC and it was negligible when compared with the high expression of collagens and other matrix components in MFB. MMP-7 and MMP-12 were less affected in activated HSC but their expression in MFB was very low. These enzymes are responsible for the degradation of native and denatured collagen, elastin, glycoproteins and proteoglycans (Iredale, 1996; Arthur, 1998). The removal of these proteins from the tissue may be slowed down when the expression of MMP is low.

In contrast to the other MMP, the expression of MMP-2 in MFB did not decrease and the expression of MMP-14 decreased only slightly. Membrane-bound MT1-MMP/MMP-14 is able to degrade collagens I and III as well as proteoglycans and glycoproteins (Arthur, 1998). Mice deficient in MMP-14 develop fibrosis in many tissues (Holmbeck et al., 2004). MMP-14 can also activate latent MMP-2. Together with MMP-2 and TIMP-2 it forms a trimolecular

complex at the cell surface (Worley et al., 2003). MMP-2 may degrade subendothelial matrix in damaged liver (Arthur et al., 1992; Lee et al., 2004) and facilitate its replacement with collagen I. This type of collagen, in contrast to complete matrix extracted from EHS tumours, supports HSC activation (Friedman et al., 1989). MMP-2 is required for lens and kidney epithelial cells to acquire a myofibroblast-like phenotype characterized by α -SMA expression (Seomun et al., 2001; Cheng and Lovett, 2003). As far as MMP inhibitors are concerned, the expression of TIMP-2 was high both in activated HSC and in MFB, the expression of TIMP-1 was somewhat less prominent. Both TIMPs have other biological activities besides MMP inhibition (Nagase and Woessner, 1999).

TGF- β 1 is a multifunctional cytokine, produced by numerous cell types, that plays a key role in liver fibrosis (Bissell et al., 2001). It induces procollagen α 1(I) mRNA expression in HSC (Cao et al., 2002). On the other hand, the expression of collagen type I mRNA in the liver of mice treated with CCl₄ can be reduced by the administration of a TGF- β soluble receptor to the animals (Yata et al., 2002). TGF- β 1 level is increased in liver of patients with active liver disease (Annoni et al., 1992). We found that the relative expression of TGF- β 1 was highest in quiescent HSC. It decreased during cell culture, in agreement with findings of Wickert et al. (2002). It was lower in cirrhotic cells than in normal cells and the lowest expression was found in MFB. However, TGF- β 3 isoform may also be involved in the activation of HSC (Wickert et al., 2002). Wells et al. (2004) reported that portal fibroblasts produce large amounts of TGF- β 2 that may stimulate their proliferation by autocrine mechanism.

CTGF is considered as a downstream mediator of a part of TGF- β 1 fibrogenic effects although a direct regulatory role of TGF- β for CTGF has not been found in HSC (Gressner et al., 2002; Rachfal and Brigstock, 2003). Both CTGF and TGF- β 1 mRNA levels are increased in human cirrhotic liver. CTGF mRNA can be detected in connective tissue septa and in HSC within cirrhotic nodules (Abou-Shady et al., 2000). CTGF stimulates HSC migration, proliferation and collagen gene transcription (Paradis et al., 2002). In our experiments, the expression of CTGF in MFB was much higher than in HSC, in relation to TGF- β 1.

Microarray analysis and mathematical methods we used allowed us to detect the shifts in gene expression accompanying the activation of HSC and to show the differences between MFB and culture-activated HSC. In the future, these methods may be used to study the effects of treatment designed to suppress HSC activation or connective tissue production by MFB. The advantage of the microarray analysis is a large number of genes that can be studied. A limitation of the method is a relatively low range of mRNA/cDNA concentrations that can be determined.

In the present experiments we used MFB obtained by passaging HSC cultures isolated from normal or cirrhotic rat liver. The results obtained in this study and the results published previously (Jiroutova et al., 2005) suggest that HSC from cirrhotic liver are already partially activated at the time of isolation, as far as the expression of connective tissue components and immunocytochemical markers is concerned. The cirrhotic cells differed from normal ones in the rate ³H-thymidine incorporation. When the cells were cultured on plastic, most differences disappeared. The conversion of the culture character after 5-fold passaging was demonstrated by an increase in fibulin-2 expression. MFB obtained in this way strongly expressed collagen and several other connective tissue proteins. Perlecan expression dominated among proteoglycans we examined. Most MMPs were suppressed except those possibly involved in myofibroblastic transdifferentiation. The expression of tissue inhibitors of MMP remained high. A remarkable difference in the expression of thrombospondin-1 and osteopontin was found between HSC and MFB. All these changes may be influenced by different expression of profibrotic cytokines TGF- β and CTGF.

Acknowledgments

The authors wish to thank to Dr. E. Cermakova for the statistical evaluation of the results. This work was supported by grants from the Grant Agency of the Czech Republic No. 305/03/1513 and from the Ministry of Education of the Czech Republic No. MSM 0021620820.

References

- Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo X-Z, Baer HU, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000;20:296–304.
- Annoni G, Weiner FR, Zern MA. Increased transforming growth factor- β 1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol* 1992;14:259–64.
- Arthur MJP. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998;59:376–80.
- Arthur MJP, Stanley A, Iredale JP, Rafferty JA, Hembry RM, Friedman SL. Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. *Biochem J* 1992; 287:701–7.
- Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor and the liver. *Hepatology* 2001;34:859–67.
- Breitkopf K, Sawitza I, Westhof JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor β effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut* 2005;54: 673–81.
- Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1956;62:315–23.
- Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC decreases TGF- β 1-induced collagen mRNA by inhibiting MAPK in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:G1051–61.
- Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000;19:597–614.
- Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 2003;162:1937–49.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Dubravko P, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001;107: 1055–61.
- Dubuisson L, Lepreux S, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Costa AMA, Rosenbaum J, et al. Expression and cellular localization of fibrillin-1 in normal and pathological human liver. *J Hepatol* 2001;34:514–22.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8681–5.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Aronson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989;264:10756–62.
- Frizell E, Liu SL, Abraham A, Ozaki I, Eghball M, Sage EH, et al. Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology* 1995;21:847–54.
- Graham JM. Fractionation of hepatic nonparenchymal cells. *Sci World J* 2002;2:1347–50.
- Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. Differences and the production of interleukin-6. *Lab Invest* 1991;65: 644–53.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Role of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7: 793–807.
- Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol* 2004;200: 11–9.
- Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 1994;302:625–39.
- Iredale JP. Matrix turnover in fibrogenesis. *Hepato-Gastroenterol* 1996;43:56–61.
- Jiang Y, Liu J, Waalkes M, Kang YJ. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing mice. *Toxicol Sci* 2004;79:404–10.
- Jiroutova A, Majdiakova L, Cermakova M, Köhlerova R, Kanta J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic liver. *Acta Med (Hradec Kralove)* 2005;48:137–44.
- Kanta J, Dooley S, Delvoux B, Breuer S, D'Amico T, Gressner AM. Tropoelastin expression is upregulated during

- activation of hepatic stellate cells and in the livers of CCL₄-cirrhotic rats. *Liver* 2002;22:220–7.
- Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005;166:1017–28.
- Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hulterantz R, et al. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003;83:163–73.
- Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A, Neubauer K, Piscaglia F, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999a;117:1205–21.
- Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *J Hepatol* 1999b;30:48–60.
- Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005;174:5740–9.
- Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2367–78.
- Li D, Friedman SL. Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The liver: biology and pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 455–68.
- Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.
- Neubauer K, Krüger M, Quadamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G, et al. Transforming growth factor- β 1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 1999;31:692–702.
- Ozaki S, Sato Y, Yasoshima Y, Harad K, Nakanuma Y. Diffuse expression of heparan sulfate proteoglycan and connective tissue growth factor in fibrous septa with many mast cells relate to unresolving hepatic fibrosis of congenital hepatic fibrosis. *Liver Int* 2005;25:817–28.
- Paradis V, Dargere D, Bonvousois F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002;82:767–73.
- Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2003;26:1–9.
- Ramadori G, Saile B. Mesenchymal cell in the liver – one cell type or two? *Liver* 2002;22:283–94.
- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990;10:1–10.
- Seomun Y, Kim J, Lee EH, Joo CH. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells. *Biochem J* 2001;358:41–8.
- Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF- β by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett* 2004;559:107–10.
- Whittington PF, Malladi P, Melin-Aldana H, Azzam R, Mack CL, Sahaj A. Expression of osteopontin correlates with portal biliary proliferation and fibrosis in biliary atresia. *Ped Res* 2005;57:837–44.
- Wickert L, Steinkrüger S, Abiaka M, Bolkenius U, Purps O, Schnabel C, et al. Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF- β -isoforms (β 1, β 2, β 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:330–5.
- Worley JR, Thompkins PB, Meng HL, Hutton M, Soloway P, Edwards DR, et al. Sequence motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) determining progelatinase A (proMMP-2) binding and activation by membrane-type metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Biochem J* 2003;372:799–809.
- Yata Y, Gotwals P, Koteliensky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF- β soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002;35:1022–30.

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

EXPRESSION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN HEPATIC STELLATE CELLS ISOLATED FROM NORMAL AND CIRRHOTIC RAT LIVER

Alena Jiroutová, Lenka Majdiáková, Martina Čermáková, Renata Köhlerová, Jiří Kanta

Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic: Department of Medical Biochemistry

Summary: Hepatic stellate cells (HSC) are located in Disse spaces of normal rat liver. In their quiescent state they serve as a storage site for vitamin A. In fibrotic liver they become activated, proliferate and they undergo transdifferentiation into myofibroblast-like cells. Changes in the cell phenotype are accompanied by changes in the cellular cytoskeleton. We have studied the expression of α -smooth muscle actin and intermediate filament proteins vimentin, desmin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by immunocytochemistry in HSC cultured for 2 or 7 days after isolation. Normal or cirrhotic rat liver was perfused with solutions of pronase and collagenase and HSC were isolated by density gradient centrifugation of the resulting cell suspension. Liver cirrhosis was produced in rats by repeated carbon tetrachloride administration. Vimentin was detected in all cells from normal and cirrhotic liver. The concentration of desmin in the cells from cirrhotic liver was slightly higher than that in normal cells and it increased with time in culture. GFAP could be detected only in normal cells 2 days after their isolation. In contrast, alpha smooth muscle actin (α -SMA) was absent from normal cells at this time but its expression was pronounced later. In most cells from cirrhotic liver this antigen was already present on the second day of culture and its expression further increased.

Key words: Liver cirrhosis; Carbon tetrachloride; Hepatic stellate cells; Vimentin; Desmin; Glial fibrillary acidic protein; α -smooth muscle actin

Introduction

Hepatic stellate cells (HSC) are localized in the spaces of Disse and their long cytoplasmic processes are in close contact with neighbouring cells, sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. In normal liver, an important function of HSC is storing vitamin A, mainly in the form of retinyl esters. HSC synthesize various types of extracellular matrix (ECM) components, fibrillar collagen types I, III and V, net-forming collagen type IV, glycoproteins laminin and fibronectin, hyaluronic acid and proteoglycans containing heparan, dermatan and chondroitin sulfate. The composition of normal liver ECM resembles that of basement membranes but no continuous membrane is present. Together with the fenestrations of endothelial cells it allows the exchange of metabolites between hepatocytes and blood. Some ECM proteins are synthesized by liver endothelial cells (10, 16, 19).

In the process of fibrogenesis, HSC are stimulated to proliferate and to undergo phenotypic transformation to contractile cells that are thought to produce majority of connective tissue in diseased liver. In damaged liver, HSC secrete a number of cytokines and growth factors, while their ability to degrade ECM is decreased. This process is

called activation or transdifferentiation and is accompanied by changes in the cellular cytoskeleton. HSC cultured on plastic for 2 days are regarded as quiescent. The quiescent phenotype can be maintained when the cells are cultured on basement membrane-like substrate. When they are cultured on plastic substrate for 5 to 7 days, they acquire activated, myofibroblast-like phenotype (4,8,16). They synthesize and secrete increasing amounts of ECM proteins and they are used to study the processes leading to ECM deposition in liver fibrosis (4,6).

Stress fibres containing α -smooth muscle actin (α -SMA) are a characteristic feature of activated HSC (17). Intermediate filaments also contain proteins that can be used as markers for HSC. Isolated HSC are positive for vimentin when cultured for 3 or 7 days on plastic (2,17). Desmin can be detected both 3 and 7 days after isolation and its expression in HSC increases during cultivation (7). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) is high after isolation but decreases quickly in culture (12).

The properties of HSC isolated from normal liver and activated by culture on plastic substrate may be different from the properties of HSC present in cirrhotic rat liver. However, the characterization of the four cytoskeletal antigens in the cells from cirrhotic liver in the literature is in-

complete and the way of fibrosis and cirrhosis induction as well as the length of treatment vary. We have compared the expression of these antigens in normal HSC and in HSC isolated from cirrhotic liver. Cirrhosis was induced in rats by repeated application of carbon tetrachloride and the expression of the four markers, α -SMA, vimentin, desmin and GFAP was determined by immunocytochemistry. The cells were examined at two time intervals, 2 days after isolation when they attached to the substrate and at 7 days when they were spread and reached confluency.

Materials and Methods

Chemicals

Carbon tetrachloride was obtained from Riedel-de Haen (Seelze, Germany), collagenase B, pronase and DNase I from Roche (Mannheim, Germany), Hank's balanced salt solution (HBSS) from Gibco (Karlsruhe, Germany), Optiprep from Nycomed Pharma (Oslo, Norway), bovine serum albumin and Oil Red O from Fluka (Buchs, Switzerland). Fetal bovine serum was obtained from PAA Laboratories (Cölbe, Germany). Dulbecco medium, fish gelatin and monoclonal antibodies against GFAP (clone G-A-5) and α -SMA (clone 1A4) were from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Monoclonal antibodies against vimentin (clone V9) and desmin (clone DE-R-11) and secondary antibody coupled to horseradish peroxidase and diaminobenzidine were obtained from Dako (Glostrup, Denmark), mouse gamma globulins from Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA). Other chemicals were from Serva (Heidelberg, Germany).

Animal treatment, cell isolation and culture

Male Wistar rats weighing 250–300 g were obtained from VUFB breeding station (Konárovice, Czech Republic). The rats received humane treatment in accordance with Czech laws. Cirrhosis was produced by giving the rats 1 ml/kg CCl_4 by gavage twice a week for 9 weeks. The toxin was dissolved in olive oil 1:1 (v/v).

Hepatic stellate cells were isolated from normal liver or from cirrhotic liver 3 days after the last CCl_4 dose and the procedure described by Knook et al. (9) was adapted. The liver was perfused through the portal vein in situ successively with Ca^{2+} -free HBSS for 10 min., with 100 ml 0.2% pronase solution and with 0.013% collagenase solution. The enzymes were dissolved in complete HBSS and the rate of perfusion was 10 ml/min. It was stopped when the liver looked digested. The resulting cell suspension was incubated with 0.01% DNase for 15 min. at 37 °C in a shaking water bath and then filtered through 42 μm nylon mesh (Silk & Progress, Moravská Chrástová, Czech Republic). The cells were centrifuged at 400 g for 7 min. and washed with HBSS. Commercially available 60 % Optiprep was added to the final concentration 11.5% (3) and the suspension overlaid with 0.5 ml HBSS was centrifuged at 1400 g for 22 min. The cells on the top of Optiprep layer were collected.

The cells were cultured in Dulbecco medium containing 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. They were harvested 2 and 7 days after plating, respectively. They were fixed in 4 % paraformaldehyde dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and kept in PBS at 4 °C until use.

A portion of the right lateral liver lobe removed at the beginning of the perfusion was fixed in 4 % formaldehyde, embedded in paraffin and saved for histological examination.

Oil Red staining, immunocytochemistry and immunohistochemistry

The cells fixed in paraformaldehyde were incubated with saturated Oil Red O solution in 70 % ethanol for 15 min. and washed with 50 % ethanol and water.

For immunocytochemistry, the cells were permeabilized on ice by cold solution of 0.1 % Triton X-100 in 0.1 % sodium citrate for 2 min. Endogeneous peroxidase was blocked by 3% hydrogen peroxide for 30 min. Nonspecific binding sites were blocked by 50 % fetal calf serum in PBS and by a solution of 0.1 % fish gelatin and 0.5 % bovine serum albumin in PBS. The cells were incubated with the primary antibody at room temperature for 2 hours. Anti-vimentin antibody was diluted 1:100, anti-desmin 1:50, anti-GFAP 1:400 and anti- α -SMA 1:400. The kit containing the secondary antibody and peroxidase was used according to the instructions of the manufacturer.

Histological sections of liver tissue were deparaffinized and stained with haematoxylin-eosin, van Gieson stain and by silver impregnation according to Gömöri.

Results

The livers of rats treated with CCl_4 for 9 weeks had nodular appearance and some of the rats had ascites. When examined under microscope, liver architecture was distorted with broad connective tissue septa separating regenerative nodules. Hepatocyte degeneration was seen. Argyrophilic material was found in the sinusoids of normal liver but in cirrhotic liver mainly the septa gave a positive reaction (Fig. 1 a–f).

Hepatic stellate cells from both normal and cirrhotic livers contained fat droplets stained with Oil Red O. They were present in both cell types 2 days after isolation and persisted for 7 days of cultivation (Fig. 2 a–d).

HSC from normal liver did not contain α -SMA 2 days after isolation but about one half of them were positive when they were cultured for 5 more days. Eighty percent of HSC from cirrhotic liver expressed α -SMA as early as 2 days after isolation and almost 100% cells showed strong expression of α -SMA at 7 days. The cells also increased in size (Fig. 3 a–d).

Vimentin was detected in both cell types at the two time intervals examined. It was present in all HSC and its expression increased during cultivation (Fig. 4 a–d). Desmin

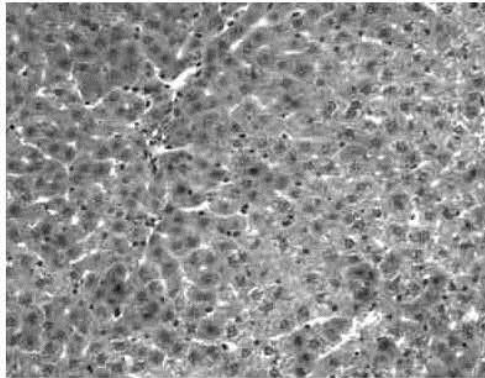


Fig. 1a: Normal liver, haematoxylin-eosin.

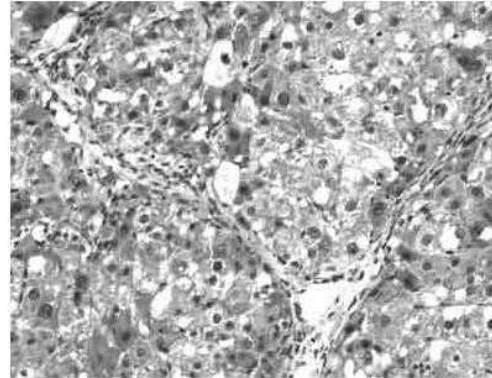


Fig. 1b: Cirrhotic liver, haematoxylin-eosin.

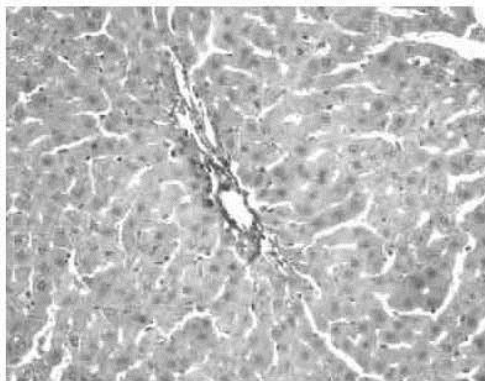


Fig. 1c: Normal liver, van Gieson technique.

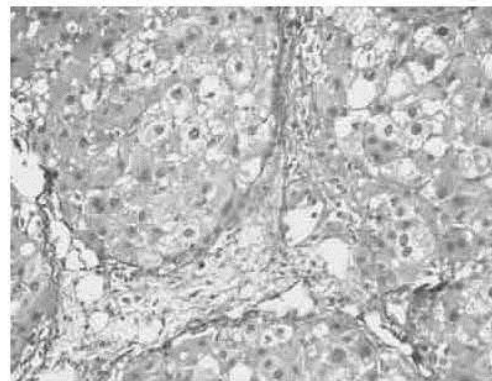


Fig. 1d: Cirrhotic liver, van Gieson technique.

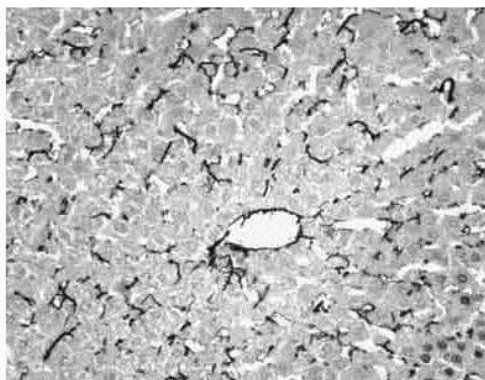


Fig. 1e: Normal liver, Gömöri's silver impregnation.

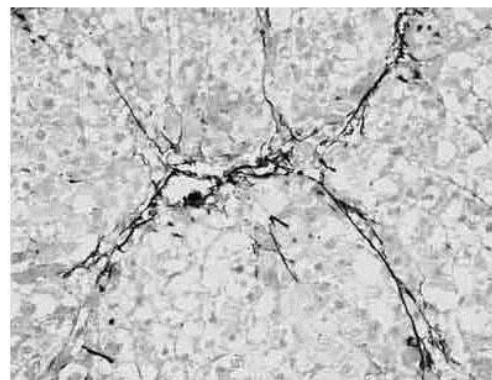


Fig. 1f: Cirrhotic liver, Gömöri's silver impregnation.

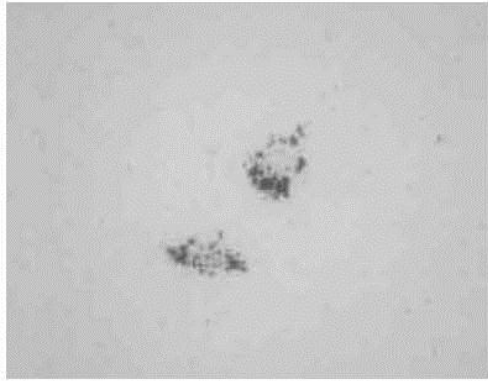


Fig. 2a: HSC from normal liver, 2 days in culture, Oil Red O.

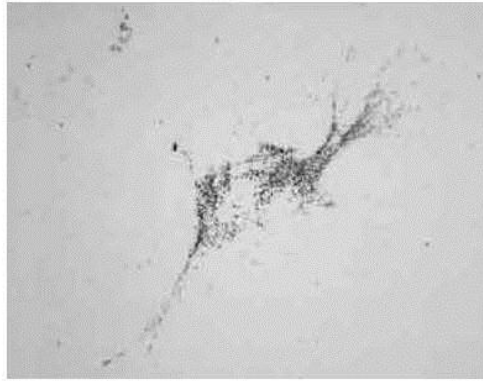


Fig. 2b: HSC from normal liver, 7 days in culture, Oil Red O.

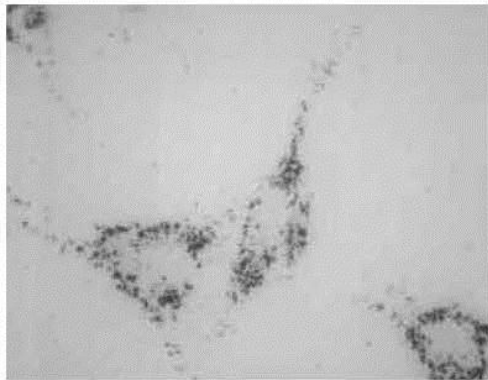


Fig. 2c: HSC from cirrhotic liver, 2 days in culture, Oil Red O.

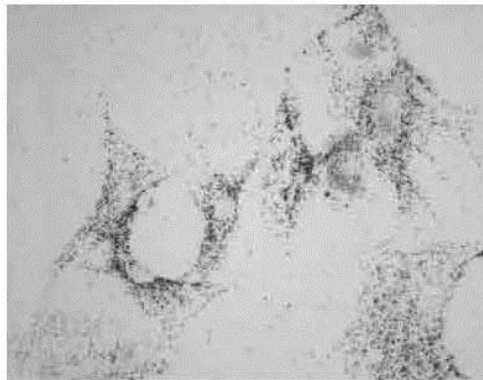


Fig. 2d: HSC from cirrhotic liver, 7 days in culture, Oil Red O.

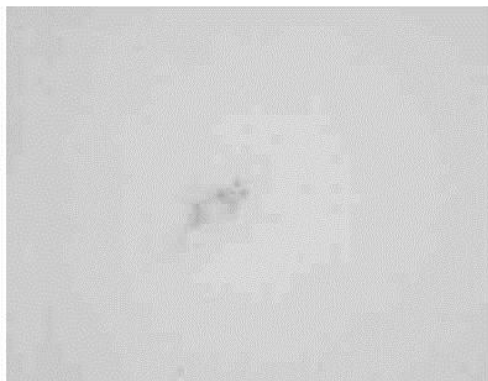


Fig. 3a: HSC from normal liver, 2 days in culture, α -SMA.

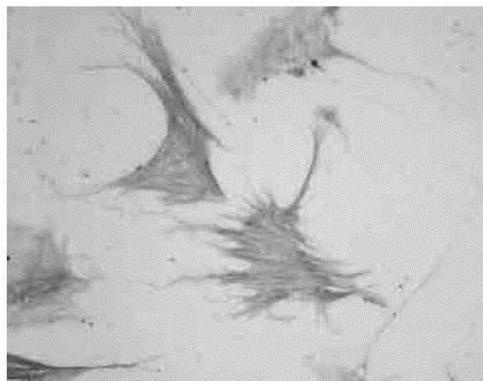


Fig. 3b: HSC from normal liver, 7 days in culture, α -SMA.

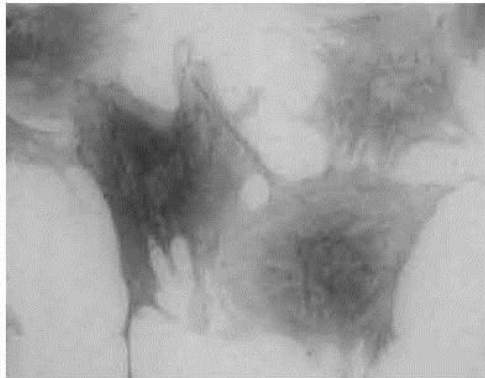


Fig. 3c: HSC from cirrhotic liver, 2 days in culture, α -SMA.

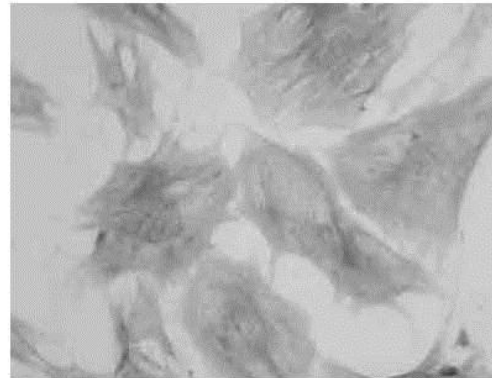


Fig. 3d: HSC from cirrhotic liver, 7 days in culture, α -SMA.

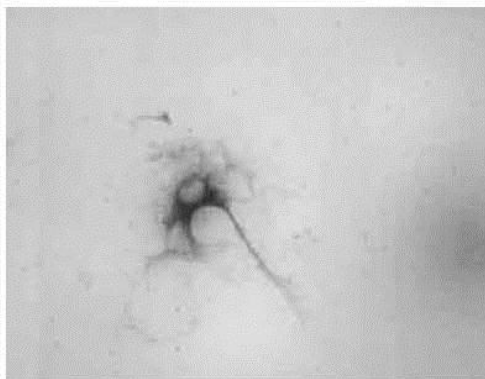


Fig. 4a: HSC from normal liver, 2 days in culture, vimentin.

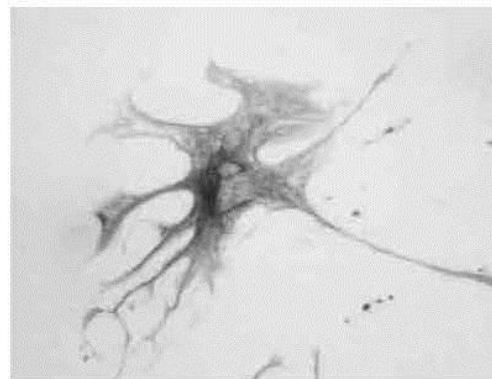


Fig. 4b: HSC from normal liver, 7 days in culture, vimentin.



Fig. 4c: HSC from cirrhotic liver, 2 days in culture, vimentin.

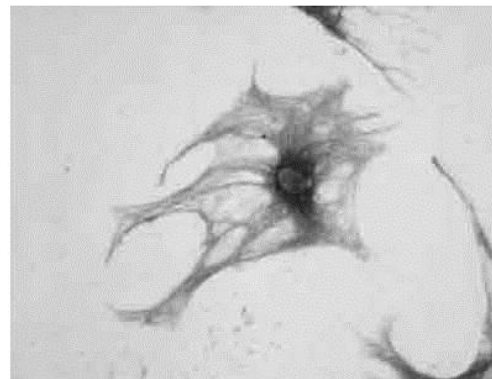


Fig. 4d: HSC from cirrhotic liver, 7 days in culture, vimentin.

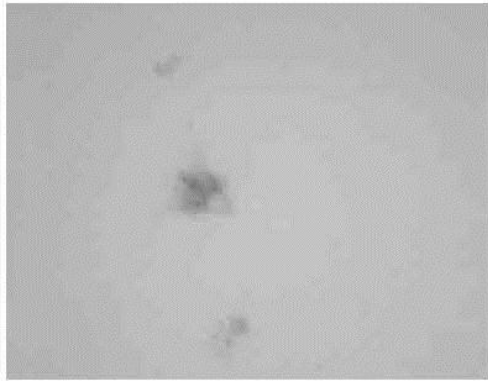


Fig. 5a: HSC from normal liver, 2 days in culture, desmin.

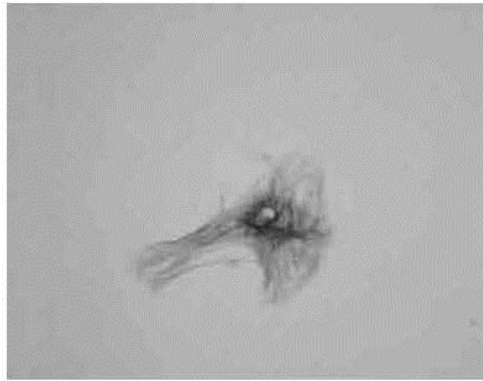


Fig. 5b: HSC from normal liver, 7 days in culture, desmin.



Fig. 5c: HSC from cirrhotic liver, 2 days in culture, desmin.

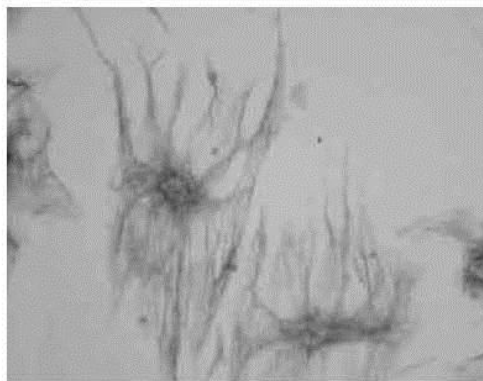


Fig. 5d: HSC from cirrhotic liver, 7 days in culture, desmin.

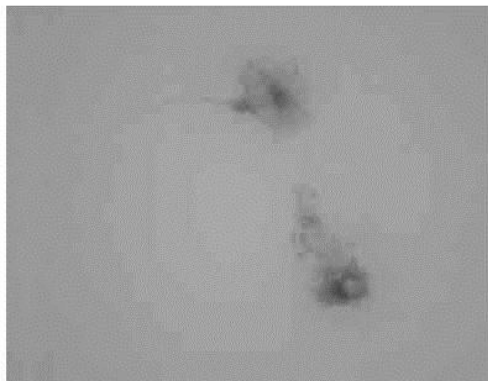


Fig. 6a: HSC from normal liver, 2 days in culture, GFAP.

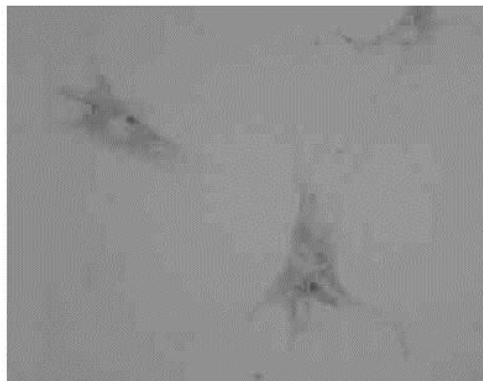


Fig. 6b: HSC from normal liver, 7 days in culture, GFAP.

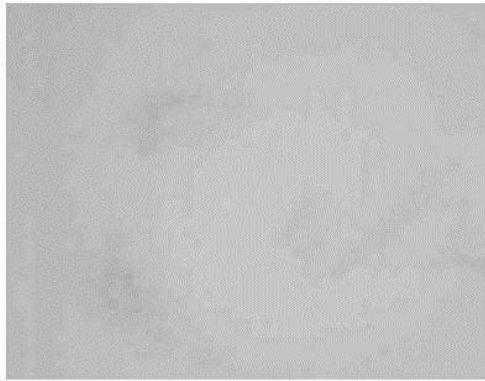


Fig. 6c: HSC from cirrhotic liver, 2 days in culture, GFAP.

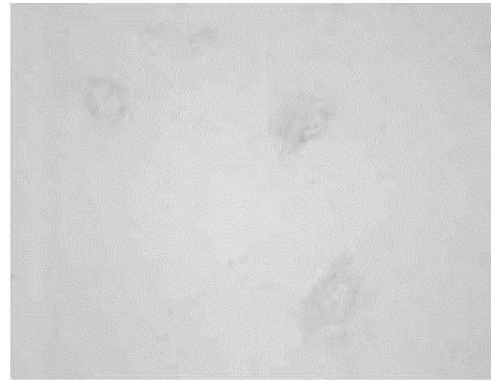


Fig. 6d: HSC from cirrhotic liver, 7 days in culture, GFAP.

Tab. 1: The expression of cytoskeletal antigens in HSC from normal and cirrhotic liver.

	N	C	N	C
Days in culture	2	2	7	7
α -SMA	-	++ 80 %	++ 50 %	+++ 100 %
Vimentin	++ 100 %	+++ 100 %	+++ 100 %	+++ 100 %
Desmin	+ 45-60 %	++ 60 %	++ 45-60 %	+++ 95-100 %
GFAP	++ 100%	-	-	-

The intensity of staining is indicated (- no staining, +, ++, +++ increasing intensity).

N - normal liver, C - cirrhotic liver. The percentage of positive cells was determined by counting HSC in the cultures originating from 3 normal and 3 cirrhotic liver. Three hundred cells were counted in each culture and the range of the results is shown.

was poorly expressed in normal cells 2 days after isolation but its expression increased in culture. About 50 % cells were positive and this number did not change during cultivation. In contrast, desmin expression in the cells from cirrhotic liver was prominent in more than a half of cells at 2 days and the number of positive cells increased to 95-100% at 7 days (Fig. 5 a-d). The expression of GFAP was found in normal cells at 2 days when all cells were labelled. The marker was lost during cultivation. The HSC from cirrhotic livers were negative at both time intervals (Fig. 6 a-d). The results of antigen analysis are summarized in Table 1.

Discussion

Carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats resembles human disease in some features: extensive necrosis, nodules of regenerating hepatocytes surrounded by connective tissue

septa and a severalfold increase in collagen content (14). Nine-week treatment of rats with carbon tetrachloride with 2 intragastric doses of the toxin per week results in fairly reproducible fully developed liver cirrhosis (1).

Quiescent HSC found in normal liver do not express α -SMA, the marker of HSC activation. Cytoplasmic immunoreactivity against this antigen appears when isolated HSC grow on plastic substratum and spontaneously transform to myofibroblast-like cells (11, 18). In agreement with this theory, the HSC from normal liver were negative for α -SMA early after isolation. Judging by their α -SMA content, a majority of HSC obtained from cirrhotic liver were already activated 2 days after isolation and after 7 days of culture the number of activated, strongly positive cells reached 100 %.

Vimentin, desmin and GFAP are intermediate filament proteins. Vimentin is consistently found in normal HSC

and other mesenchymal cells (10, 18). It was also strongly expressed in the HSC we isolated from the cirrhotic liver.

Desmin is a protein necessary for proper functioning of muscle (13). It is also found in HSC of rat origin and suggests their relationship to muscle cells. Only a part of normal HSC express this antigen (11) which was also reflected in our results. However, almost all HSC from cirrhotic liver were strongly positive for desmin. It is still an open question if there is a functional difference between desmin-positive and desmin-negative HSC (10).

GFAP is a glial-specific protein found in long processes of astrocytes (20). It was suggested as a specific marker for HSC (12). It seems to be expressed in quiescent cells only. It disappeared in normal cells after a week of culture and was not found in HSC from cirrhotic liver.

The loss of lipid droplets is considered by some authors a sign of HSC transdifferentiation into myofibroblast-like cells (5, 15). We did not observe any significant change in Oil Red staining in the course of HSC activation.

As an introduction to our studies of gene expression in hepatic stellate cells in liver cirrhosis we used four cytoskeletal antigens to characterize these cells isolated from cirrhotic liver and to compare them with HSC isolated from normal rat liver. Using immunocytochemical methods we have found that the cells from cirrhotic liver show similar tendencies in cytoskeletal antigen expression as normal HSC activated on plastic but the changes are more profound. Both the intensity of antigen expression and the number of cells involved are usually larger in cirrhotic cells than in normal ones.

Acknowledgment

This study was supported by grants GAČR 305/03/1513, MSM 002160820 and MSM 111500003

References

1. Bickel M, Baringhaus KH, Gerl M, Günzler V, Kanta J, Schmidts L, Stapf M, Tschank G, Weidman K, Werner U. Selective inhibition of hepatic collagen accumulation in experimental liver fibrosis in rats by a new prolyl 4-hydroxylase inhibitor. *Hepatology* 1998;28:404-411
2. Buniatian G, Hamprecht B, Gebhardt R. Glial fibrillary acidic protein as a marker of perisinusoidal stellate cells that can distinguish between the normal and myofibroblast-like phenotypes. *Biol Cell* 1996;87:65-73
3. Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor- κ B in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of I κ B family proteins. *Hepatology* 1999;30:761-769
4. Friedman SL, Roll FJ, Bozles J, Arenson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989;264:10756-10762
5. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *New England J Med* 1993;328:1828-1835
6. Geerts A, Vrijzen R, Rauterberg J, Burt A, Schellinck, Wisse E. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol* 1989;9:59-68
7. Geerts A, Niki T, Hellemans K, De Craemer D, Van Den Berg K, Lazou JM, Stange G, Van De Winkel, De Bleser P. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology* 1998;27:590-598
8. Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998;292:447-452
9. Knook DL, Sefelaar AM, de Leeuw. Fat-storing cells of the rat liver. *Exp Cell Res* 1982;139:468-472
10. Li D, Friedman SL. Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 455-468
11. Mathew J, Geerts A, Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *Hepato-Gastroenterol* 1996;43:72-91
12. Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1996; 24:719-730
13. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 2004; 301:1-7
14. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983; 3:112-120
15. Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmac Ther* 1995; 66:387-412
16. Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19:397-410
17. Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, Meyer zum Büschenfelde KH. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1990;59:349-357
18. Rockey DC, Friedman SL. Cytoskeleton of liver perisinusoidal cells (lipocytes) in normal and pathological conditions. *Cell Motil Cytoskeleton* 1992;22:227-234
19. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3-15
20. Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RKH. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol* 1991; 112:1205-1213

Submitted May 2005.

Accepted July 2005.

*Doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.,
Charles University in Prague,
Faculty of Medicine in Hradec Králové,
Department of Medical Biochemistry,
Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové,
Czech Republic.
e-mail: kanta@lfhk.cuni.cz*