

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



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

Lenka Bittnerová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská chemie a biochemie

Hradec Králové

2013

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

Autor: Mgr. Lenka Bittnerová
Ústav lékařské biochemie

Školitel: doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.
Ústav lékařské biochemie

Oponenti: prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Doc. MUDr. Vladislav Krtek, CSc.
Gastroenterologická ambulance (Praha)

..

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM 0021620820, projektem č. 86/2006/C GAUK a projektem PRVOUK P37/01

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

doc. MUDr. Jaroslav Cerman, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

OBSAH

1.	SOUHRN	4
2.	SUMMARY	5
3.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
4.	CÍLE PRÁCE.....	7
5.	METODICKÁ ČÁST	8
6.	VÝSLEDKY	9
6.1.	Charakteristika klidových a aktivovaných HSC	9
6.1.	Stanovení apoptózy C3 HSC.....	11
6.2.	Analýza exprese genů u N HSC a C3 HSC.....	12
6.3.	Vliv kolagenního gelu na apoptózu vyvolanou pomocí toxinů.....	15
7.	DISKUSE.....	17
8.	ZÁVĚR	21
9.	LITERATURA	22
10.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	24

1. SOUHRN

Jaterní fibróza vzniká v důsledku chronických jaterních onemocnění a působením nejrozličnějších příčin či podnětů. Dochází k nadměrné tvorbě, hromadění a ukládání extracelulární matrix (ECM), především kolagenu typu I, která způsobuje přestavbu jater a může přejít až v jaterní cirhózu. Jde o dynamický proces novotvorby a odbourávání ECM, které je produkováno zejména jaterními hvězdicovými buňkami (HSC). HSC se nacházejí v Disseho prostoru, hrají důležitou roli v hospodaření s vitamínem A. Při poškození jater se z klidového (quiescent) stadia aktivují, proliferují, získávají myofibroblastový fenotyp a produkují velké množství ECM. Experimentální studie prokázaly vratnost fibrotického procesu, přičemž možnost, jak snížit počet nadbytečných aktivovaných HSC je odstranění pomocí programované buněčné smrti (apoptózy), nebo návrat zpět do klidového stavu.

Cílem naší práce bylo popsat a navzájem porovnat buňky klidové, aktivované *in vitro* a *in vivo*. Zaměřili jsme se na vliv trojrozměrné kolagenní matrix na apoptózu jaterních hvězdicových buněk, neboť vliv kolagenu typu I na apoptózu nebyl doposud sledován.

In vivo byla aktivace HSC vyvolána intragastrickým podání třech dávek tetrachlormethanu potkanům. *In vitro* jsme apoptózu indukovali třemi rozdílnými toxiny – gliotoxinem, cykloheximidem a cytochalasinem D. HSC jsme izolovali z normálních i akutně poškozených jater potkanů enzymatickou perfuzí a centrifugací v hustotním gradientu. Izolovali jsme HSC s odlišnými fenotypy – klidové, aktivované *in vitro* a *in vivo*, a ty byly kultivované na plastu a na kolagenním gelu po 7 dní. Sledovali jsme dynamiku jejich růstu, morfologii, expresi 94 genů pomocí oligo cDNA, imunocytochemicky hladkosvalový α -aktinu (α -SMA) a apoptotické proteiny Bax a Bcl-2. Apoptóza byla detekována kombinací dvou nezávislých metod – fluorescenčními barvivy a průtokovou cytometrií.

Klidové HSC z nepoškozených jater se na plastu transdiferencovaly na buňky aktivované s myofibroblastovým genotypem i fenotypem. Během aktivace došlo k řadě změn v expresi různých skupin genů, které jsme sledovali pomocí oligo cDNA arrayí. Kolagenní gel ovlivnil morfologii všech buněk, které tak získaly vzhled podobný buňkám *in vivo*. Aktivované HSC se vyznačují pozitivitou α -SMA způsobující jejich kontraktilní vlastnosti. Ten se prodlužující kultivací na kolagenním gelu u části buněk vytratil, což potvrdilo teorii, že se část aktivovaných HSC navrácí do klidového stadia. Část aktivovaných buněk podléhala spontánní apoptóze, jíž byl nadbytečný počet HSC regulován. Procento apoptotických buněk kultivovaných na kolagenním gelu bylo u všech typů buněk výrazně vyšší, stejně jako se zvyšoval apoptotický index proteinů Bcl-2 rodiny. Zavedli jsme metody navození apoptózy pomocí gliotoxinu, cyklohemidu a cytochalasinu D. Kolagenní gel zároveň potencoval a urychloval apoptózu vyvolávanou toxiny, přestože je mechanismus účinku navození apoptózy je u každého z nich jiný.

Interakce jaterních hvězdicových buněk v poškozených játrech se složkami extracelulární matrix hraje důležitou roli v návratu fibrotického poškození k původnímu stavu. Lze tedy říci, že nezáleží na tom, jakým způsobem byla apoptóza způsobena, ale kolagenní matrix, která se v játrech akumuluje při rozvoji jaterní fibrózy, tento proces akceleruje a může velmi výrazně ovlivnit životní cyklus a chování jaterních hvězdicových buněk. Proto je navození či ovlivnění apoptózy HSC v dnešní době významným, strategicko-terapeutickým, antifibrotickým cílem.

2. SUMMARY

Liver fibrosis represents a significant worldwide health problem. It is a response of liver to repeated injury and it is characterized by breakdown of normal extracellular matrix (ECM) resembling basement membrane in composition and by accumulation of ECM containing fibrillar type I collagen. Although more than one potential source of ECM exist, the largest part of connective tissue components is synthesized by activated hepatic stellate cells (HSC). Hepatic stellate cells are located in the space of Disse between endothelial cells and parenchymal cells and their main function is the uptake and storage of vitamin A and other retinoids. Inducing or accelerating their apoptosis is a potential way of liver fibrosis treatment.

Aim of our study was to find out how collagen gell influences HSC as the effect of ECM on HSC apoptosis has not been studied yet. We have used gel made of type I collagen, the main component of fibrotic liver ECM, to study how it affects spontaneous apoptosis of HSC isolated from carbon tetrachloride damaged liver and the apoptosis of normal HSC exposed to apoptosis inducing agents, gliotoxin, cycloheximide and cytochalasin D, in vitro.

HSC were prepared by perfusion of rat normal and cirrhotic liver with pronase and collagenase solutions, followed by centrifugation of the cell suspension on a density gradient. HSC were cultivated on plastic dishes or collagen gel for 6 days. We observed three different types of HSC – quiescent, activated in vivo and vitro, and examined their growth, proliferation, activation and mainly apoptosis. We used imunocytochemical detection of α -SMA and apoptotic proteins Bcl-2 family. Also oligo cDNA array for determination of gene expression was used. Two independent methods were used to determine apoptosis, it was quantified by a specific staining of cell nuclei and by flow cytometry.

HSC from normal liver were quiescent, but they became activated after plating on plastic dishes and on collagen gel. Collagen gel influenced morfology of HSC, their proliferation and apoptosis. HSC cultured on gel resembled star-shape cells observed in vivo. Activated HSC α -SMA positive that is responsible for cell contractile features. α -SMA partially dissappear with prolonged time of cultivation on gel which supports the thesis that activated HSCs may revert back to quiescence. Part of activated HSC underwent spontaneous apoptosis in vivo and in vitro. We have found that type I collagen enhances HSC apoptosis regardless of the agent triggering this process. Apoptotic rate in the cells on collagen was significantly higher when compared to the cells on plastic.

Enhancing this process could lead to a more rapid resolution of liver fibrosis. Excessive deposition of ECM, especially of collagen I, may influence morphology, function and fate of HSC as shown by cultivation of these cells on collagen gel.

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

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

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

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

4. CÍLE PRÁCE

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

Kladli jsme si za cíl:

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

5. METODICKÁ ČÁST

Projekt pokusů byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Veškeré práce se zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK. Zvířata byla chována v klimatizovaných místnostech s teplotou 22 °C a cykly světla a tmy po 12 h. Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab, Praha). Jaterní hvězdicové buňky jsme izolovali z normálních a akutně poškozených jater pomocí tří dávek tetrachlormetanu intragastricky. HSC byly izolovány na hustotním gradientu z jater po enzymatické perfuzi. Postup je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2005).

Buňky byly kultivovány na plastu a na gelu připraveném z kolagenu typu I. Kolagen typu I byl extrahován z ocasních šlach potkanů, postup vychází z metody Elsdala (1972). Výsledná koncentrace kolagenu v gelu byla 0,1 %. Jaterní tkáň pro imunohistochemické vyšetření byla fixována formaldehydem a zalita do parafinových bločků. Histologické řezy jsme obarvili hematoxylinem-eozinem, barvením dle Gömöriho a modrým trichrómem. Pro cytochemickou detekci jsem použili specifických protilátek na α -SMA, Bcl-2, Bax.

Pro detekci apoptózy jsme použili dvě nezávislé metody. Fluorescenční barvení jader pomocí DAPI umožňuje lepší posouzení struktury chromatinu, kombinace fluorescenčních barviv akridinové oranže a ethidium bromidu umožňuje odlišit živé a umírající HSC. Dále byla využita analýza buněk pomocí průtokové cytometrie s využitím subG1 píku k detekci apoptotických buněk.

Z buněk jsme vyextrahovali RNA fenol-chloroformovou extrakcí. Expresi genů jsme stanovovali pomocí oligo cDNA arrayí. Postup je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2007).

Vyvolání apoptózy in vitro bylo způsobeno účinkem tří toxinů - vlivem gliotoxinu (1,5 μ M po dobu 5 hodin, GLT), cykloheximidu (50 μ M po dobu 14 hod, CHX) a cytochalasinu D (5 μ g/ml (0,01 μ M) po dobu 24 hod, CYT D). Byly použity HSC, které byly izolované z nepoškozených jater potkanů kultivovaných na plastových miskách či kolagenních gelech po dobu 7 dní. Toxiny byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), který byl použit jako kontrola. Stanovení laktátdehydrogenázy (LDH) v médiu se provádí k ověření, zdali buňky umírají buněčnou smrtí – apoptózou, nebo došlo k nekróze toxickým poškozením. Metoda je založena na spektrofotometrické detekci. 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.

6. VÝSLEDKY

Před perfuzí jater byl odebrán do formalinu levý laterální lalok pro histologickou analýzu. Řezy jsme obarvili standardními histologickými barvenými – hematoxylinem-eozinem, modrým trichromem a Gömöriho barvením. Patrná byla počínající přestavba jaterního parenchymu, poškozené hepatocyty umírající nekrózou či apoptózou (prázdné prostory v jaterním parenchymu) byly nahrazeny viditelnou akumulací vaziva – jak retikulárních vláken, tak kolagenu v malém množství v okolí v. *centralis* i v jaterním parenchymu.

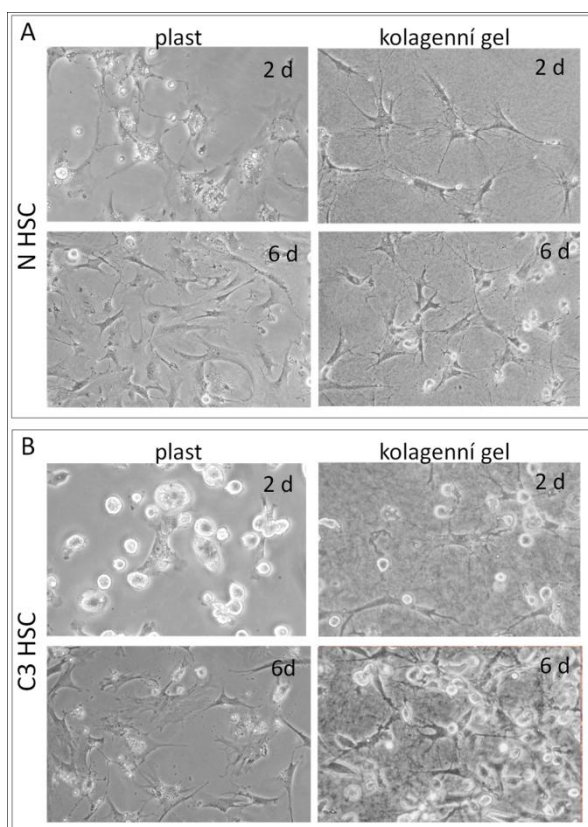
6.1. Charakteristika klidových a aktivovaných HSC

Rozhodli jsme se zaměřit na buňky izolované 24 hod z jater akutně poškozených od poslední třetí dávky tetrachlormethanu a zároveň z nepoškozených jater. Získali jsme je enzymatickou perfuzí jater potkanů a opakovanou centrifugací vzniklé buněčné suspenze v hustotním gradientu. Frakce klidových a aktivovaných buněk byly vysety na plastové misky, či kolagenní gely a kultivovány až po dobu 7 dnů. Metoda sledování autofluorescence vitamínu A v lipidových kapénkách slouží k ověření čistoty izolované frakce neparenchymových buněk, zjistili jsme autofluorescenci u 70 % čerstvě izolovaných buněk. Protože je obsah tukových kapének v HSC proměnlivý, byl také použit pro ověření čistoty specifický marker pro HSC kyselý gliový fibrilární protein (GFAP). Pomocí něho byla zjištěna čistota více než 95 % (Jiroutová, 2005).

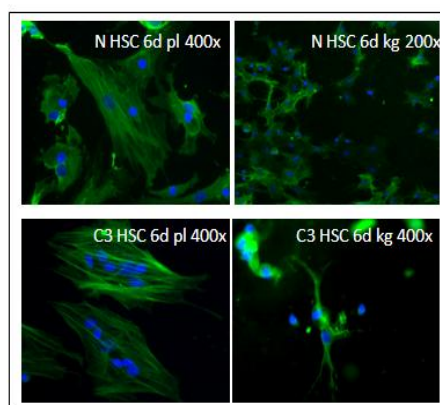
Klidové (quiescent) HSC izolované z nepoškozených jater (N HSC) se na plastu během šestidenní kultivace tzv. aktivují (Knittel, 1999). Po vysazení měly kulovitý tvar s lipidovými částicemi s vitamínem A, které postupně ubývaly. Aktivací byly více rozprostřené, markantní byla vzrůstající exprese alfa aktinu hladké svaloviny (α -SMA). Po izolaci jsou klidové, neaktivované N HSC neschopné kontrakce, α -SMA zcela chybí (Neubauer, 1996). Po dvoudenní kultivaci na plastu byla pozitivita pro α -SMA stanovena u 14 % buněk, s prodlužující se dobou kultivace (šestý den) se procento α -SMA zvýšilo až na 98 %. Morfologie buněk kultivovaných na kolagenu gelu je pozměněná díky trojrozměrnému prostředí. N HSC byly na gelu štíhlejší, s dlouhými výběžky kopírujícími kolagenní fibrily. Svým tvarem více připomínaly hvězdicové buňky, které jsou nalézány in vivo. Na kolagenním gelu byl sledován rychlejší průběh aktivace, druhý den bylo pozitivních 40 % buněk, zatímco šestý den bylo nalezeno pouze 76 % α -SMA pozitivních buněk. **Aktivované C3 HSC** měly na plastu zpočátku kulovitý tvar, postupem času jich část proliferovala, a s prohlubujícím se procesem aktivace se buňky změnilly v polygonální s mnoha výběžky. C3 HSC jsou buňky aktivované in vivo, a proto vykazovaly druhý den kultivace na plastu pozitivitu α -SMA 94 %. Část buněk ale odumírá buněčnou programovanou smrtí – apoptózou. Při apoptóze dochází ke změně tvaru buňky, pyknóze jádra a vzniku apoptotických tělísek, která se odlučují do média. Na kolagenu měla část C3 HSC svůj charakteristický hvězdicový tvar, který je nalézán in vivo, a část opět svítící kulovitý tvar, hladina α -SMA je 98 %. Buňky velmi rychle rostly a lišily se od buněk rostoucích na plastu – měly štíhlejší, protáhlá těla s četnými, dlouhými výběžky. V šestém dnu kultivace už vypadaly podobně jako na plastu. Zatímco na plastu zůstává počet α -SMA pozitivních buněk během kultivace stále stejný, na kolagenním gelu došlo k statisticky významnému poklesu až na 63 %. Morfologicky byla viditelná apoptóza a část buněk se navrácí do klidového stadia (Obr. č.1).

Stanovení proliferace N HSC i C3 HSC. Z počátečního množství 500 tisíc se počet buněk v průběhu kultivace sedmi dnů po vysazení mění. N HSC proliferují na obou površích s rozdílnou dynamikou v čase, kolagen podporuje proliferaci, rychleji se množí, od třetího dne naopak dochází k

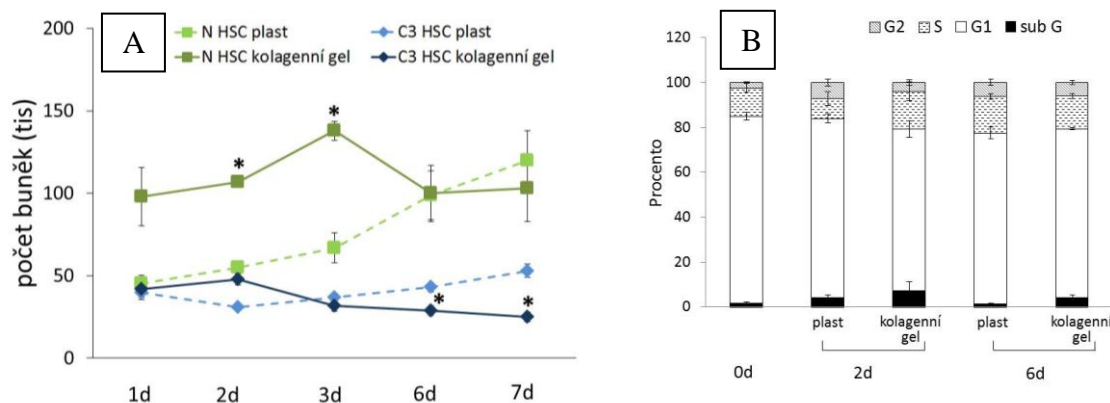
jejich postupnému ubývání. Na plastu po dvoudenní fázi stagnace začínají proliferovat a jejich množství se po šesti dnech vyrovná počtu buněk na kolagenním gelu. Počet C3 HSC se během kultivace výrazně nemění. Na plastu C3 HSC mají významně nižší proliferační schopnost, statisticky významný rozdíl vůči N HSC se projevuje od třetího až do sedmého dne. Kultivace na kolagenním gelu nemá v prvních třech dnech vliv na dělení C3 HSC, nesledujeme proliferaci nebo je balancována apoptózou, významný rozdíl v počtu buněk nacházíme až den šestý a sedmý (Obr.č.2).



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



Obrázek č. 1: Morfologie N HSC (A) a C3 HSC (B). Buňky byly kultivovány na plastových miskách a na kolagenním gelu typu I po dobu 2 a 6 dní (fázový kontrast, zvětšení 200x). Na obrázcích vpravo je imunofluorescenční detekce α -SMA (zvětšeno 400x, a 200x). Jsou zde zeleně zvýrazněny fibrily aktinu, modře jsou DAPI zvýrazněna jádra buněk. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky průměru. Statická významnost $p \leq 0.05$ (Studentův t-test).

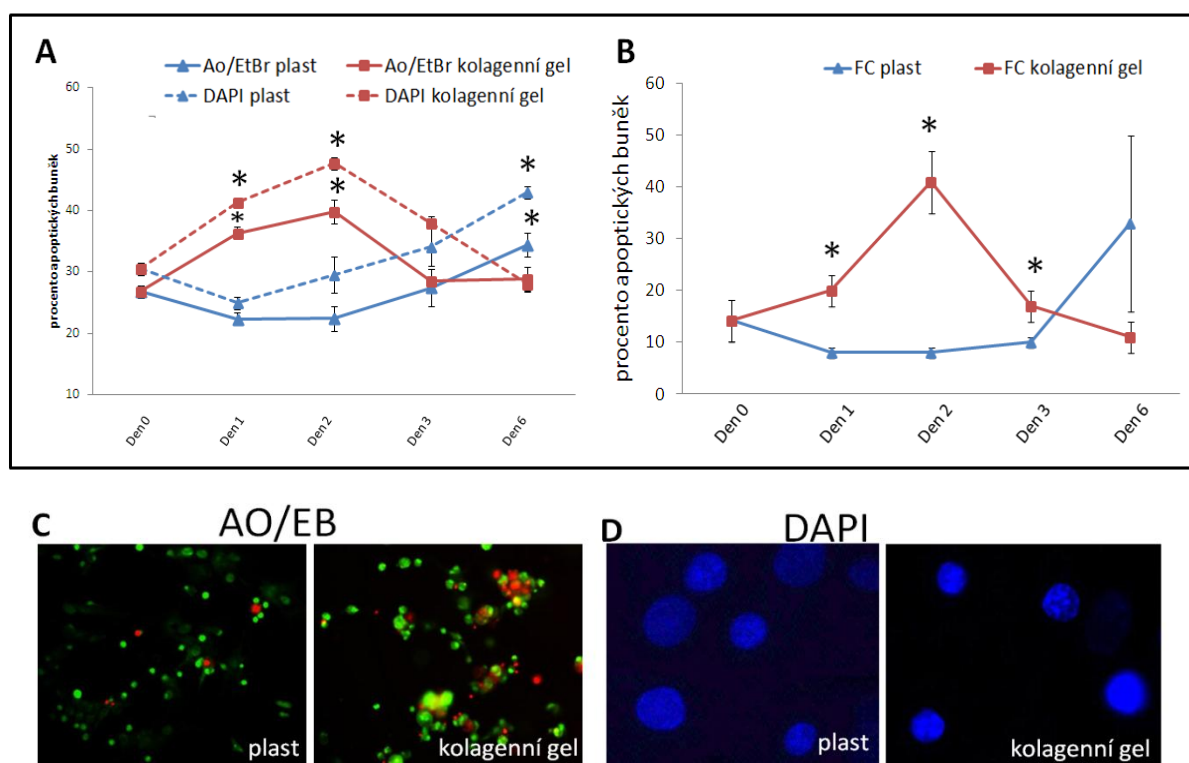


Obr. č. 2: A Stanovení počtu N HSC a C3 HSC vysazených na plast a kolagenní gel (počáteční množství buněk bylo 5×10^5) v průběhu sedmidenní kultivace. V grafu jsou uvedeny průměry a chybové úsečky odpovídající směrodatné odchylce průměru. Statisticky významné rozdíly mezi počty buněk na plastu a na kolagenním gelu je vyznačena (*). Statistická významnost ověřena Studentovým t-testem ($p \leq 0.05$). **B. Analýza buněčného cyklu N HSC průtokovou**

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

6.1. Stanovení apoptózy C3 HSC

Účelem tohoto pokusu bylo zjistit, jak ovlivňuje kolagenní prostředí apoptózu C3 HSC. K její detekci je zapotřebí použít nejméně dvou metod, aby byly výsledná data validní a proto jsme zvolili fluorescenční značení a průtokové cytometrie. K rozlišení žijících a apoptotických buněk C3 HSC bylo použito **fluorescenční barvení** pomocí AO/EtBr a DAPI. Okamžitě po izolaci bylo nalezeno 27 % buněk vykazujících apoptotické rysy barvením AO/EtBr. Nalezli jsme zvýšené procento buněk v apoptóze při kultivaci na kolagenu první a druhý den, s další kultivací (šestý den) klesla hodnota na 23 %. Na plastu jsme sledovali opačný trend, hladina apoptózy z 22 % (druhý den) postupně vzrůstala s maximem 34 % v šestém dnu kultivace. Obdobných výsledků jsme dosáhli za pomoci sledování změn jaderného chromatinu za pomoci vizualizace DAPI. Obě metody potvrdily, že kolagenní gel potencuje a rozvíjí apoptózu. Buňky v apoptóze se pomocí **průtokové cytometrie** zobrazují na konečném histogramu jako sub G1 pík. Pomocí této techniky jsme potvrdili trendy apoptotických křivek získaných pomocí fluorescenčních metod. Na kolagenním gelu je nejvyšší procento apoptotických buněk druhý den (41 %) s další kultivací klesá. Na plastu od druhého dne pozvolna vzrůstá až na 33 % ve dni šestém (Obr. 3).



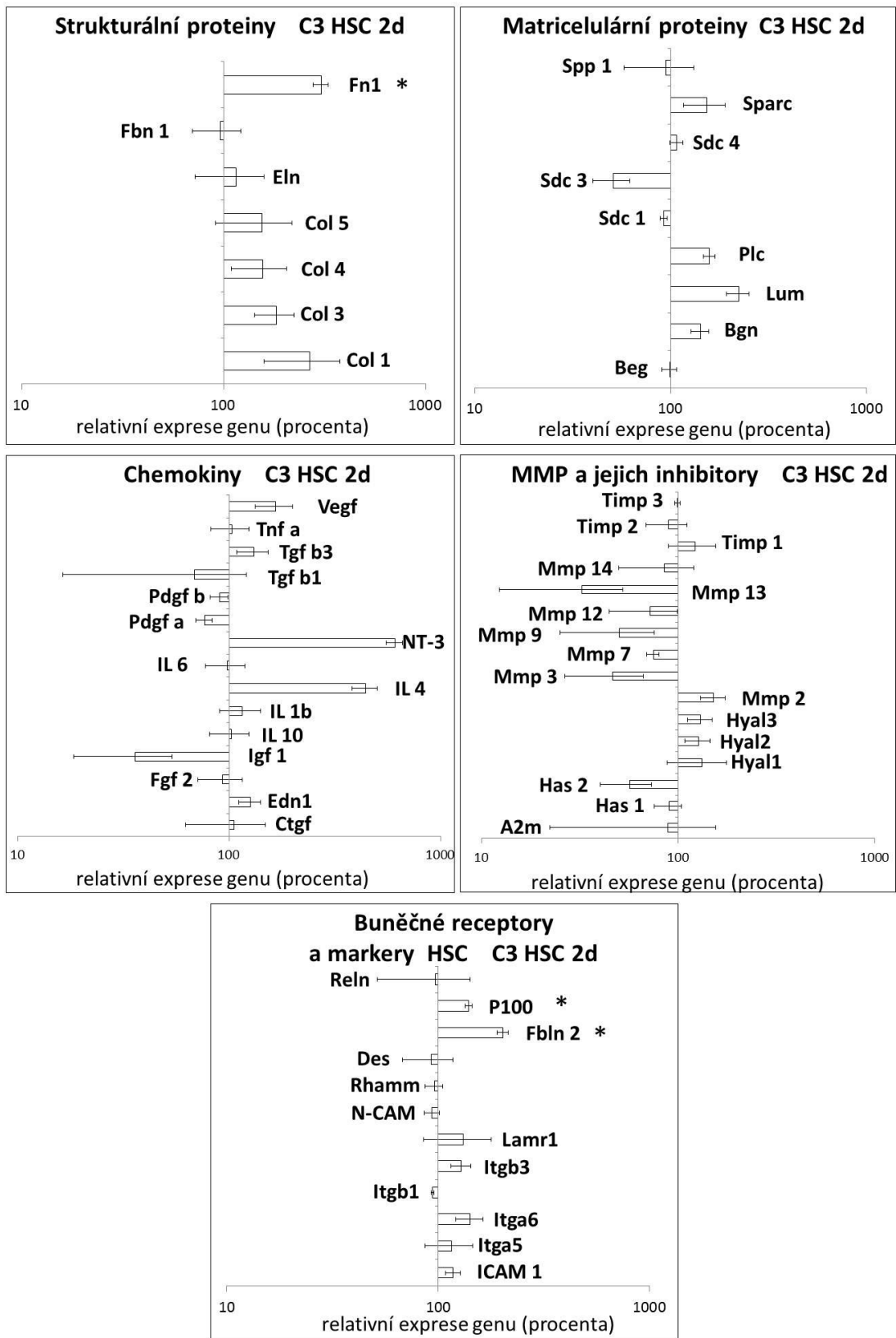
Obr. 3: Stanovení procenta apoptotických buněk s použitím fluorescenčního barvení AO/EtBr a DAPI (A) a průtokové cytometrie (B). Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n=4). Statistická významnost byla potvrzena ($p \leq 0.05$). Fotografie C3 HSC barvené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

6.2. Analýza exprese genů u N HSC a C3 HSC

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

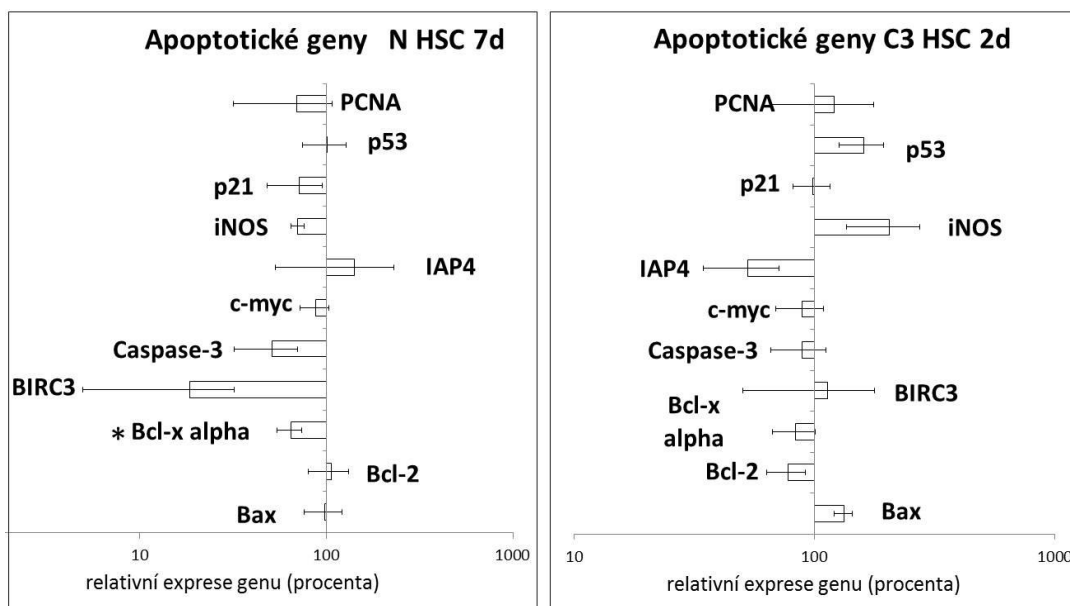
Pomocí multiplexní analýzy exprese genů užitím oligo cDNA čipů jsme sledovali expresi 94 genů souvisejících se změnami v průběhu aktivace HSC in vivo. Porovnávali jsme expresi v klidových HSC izolovaných ze zdravých jater potkanů s expresí v aktivovaných C3 HSC. Jednalo se celkem o 94 genů, které jsme pro přehlednost rozdělili do několika skupin: strukturální proteiny (7 genů), matricelulární proteiny (9 genů), chemokiny (15 genů), metaloproteázy a jejich inhibitory (16 genů), buněčné receptory a markery HSC (12 genů) a apoptotické geny (11 genů). Výsledné hodnoty exprese genů, jejichž intenzita byla vyšší než 0,2 alespoň u jednoho z intervalů, jsou uvedeny v grafech č. 1 a 2. Do grafů byla vynesena normalizovaná hodnota exprese jednotlivých genů v procentech, přičemž 100% tvoří exprese daného genu v N HSC. Geny se zvýšenou expresí jsou v pravé části grafu, geny se sníženou expresí v levé.

Strukturální a matricelulární proteiny. Klidové HSC izolované ze zdravých jater a C3 HSC aktivované in vivo patologickým procesem vyvolaným podáváním CCl_4 se liší nejen morfologicky, ale i expresí některých genů. Ve fázi akutního poškození se začínají exprimovat a tvořit právě tyto složky extracelulární matrix, které tak nahrazují matrix běžnou kolagenní matrix v játrech. Dochází zejména k dramatickému nárůstu exprese fibronektinu (Fn 1) a nesignifikantnímu leč intenzivnímu nárůstu exprese prokolagenů I, III (Col 1, Col 3). Expese elastinu (Eln) ani fibrilinu (Fbn 1) se nezměnila. Prokázali jsme zvýšení exprese prokolagenů I, III, V (expresní poměry 5,8; 5,1; 2,0). Mezi matricelulární proteiny se zvýšenou expresí, i když nesignifikantní, můžeme zařadit perlekan (Plc) a biglykanu (Bgn) a lumikan (Lum), u syndekanu 3 (Sdc3) je tomu naopak. **Chemokiny, metaloproteinázy a jejich inhibitory.** Zvýšenou syntézu složek ECM provází během rozvoje jaterní fibrózy jejich snížená degradace pomocí MMP. Při porovnání klidových N HSC a aktivovaných C3 HSC vidíme pokles exprese MMP a to MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-13. Hodnoty mají vysokou variabilitu a nejsou statisticky významné. Expese MMP-2 je naopak lehce zvýšená. Se sníženou aktivitou metaloproteinás souvisí nadprodukce jejich inhibitorů. Změny v expresi TIMP1, 2, 3 jsme nezaznamenali. Z cytokinů a růstových faktorů se nejvýrazněji zvyšují IL-4, neurotrofin (NT-3) a VEGF. **Buněčné receptory a markery HSC** Mezi nejznámější markery aktivovaných HSC řadíme fibulin-2 (Fbln 2) a P100 (Knittel, 1999). Expese obou signifikantně roste u C3 HSC. Expese integrinů se nemění, integrin $\alpha 6$ a $\beta 3$ (Itga 6, Itgb 3) roste pouze nesignifikantně. **Expese apoptotických genů.** K aktivaci N HSC dochází kultivací na plastu, buňky kultivované po dobu dvou dnů jsou považovány za klidové, během sedmidenní kultivace se mění jejich morfologie i exprese celé řady genů (Jiroutová, 2007). In vivo aktivované C3 HSC (toxickým poškozením jater) podléhají apoptóze, kulminující druhý den po izolaci. V grafu č. 2 A jsou uvedeny relativní exprese genů aktivovaných N HSC po sedmi dnech kultivace (vztaženo na klidové N HSC kultivované 2 dny, které tvoří 100 %). V části B je uvedena exprese genů aktivovaných C3 HSC (opět vztaženo na N HSC 2 dny).



Graf č. 1 : Stanovení exprese genů strukturálních proteinů ECM, matricelulárních proteinů, chemokiny, metaloproteinázy a jejich inhibitory a pro buněčné receptory a markery. Hodnoty jsou

zobrazeny jako průměr relativní exprese, 100 % je vždy exprese N HSC 2 dny. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru (n = 4).



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

Průkaz apoptotických proteinů pomocí imunocytochemie

Abychom prokázali expresi proapoptotického Bax a protiapoptotického Bcl-2 nejen na úrovni nukleových kyselin, ale i proteinů, zvolili jsme imunocytochemickou detekci u buněk N HSC a C3 HSC v intervalu 2 a 6 dní kultivovaných na platu a na kolagenním gelu. Zajímala nás změna apoptotického poměru Bcl-2 / Bax v průběhu aktivace buněk a v procesu apoptózy. Jako aktivované buňky považujeme N HSC 6 dní a C3 HSC, neboť vykazují skoro 100% expresi α -SMA. Na obrázku č. 4 jsou uvedeny tabulky s procentem pozitivních buněk a fotografie buněk s detekovanou pozitivitou apoptotických proteinů vykazující perinukleární pozitivitu. S aktivací N HSC dochází k nárůstu Bcl-2 proteinu na platu i na kolagenním gelu, stejně tak u exprese protipůsobícího proteinu Bax na kolagenním gelu (Obr. č. 4 A). Apoptotický poměr Bcl-2/Bax se v procesu aktivace zvyšuje, stoupá na platu z 0,41 na 1,02 a také na kolagenním gelu vykazuje téměř dvojnásobnou hodnotu (z 0,55 na 0,94).

U C3 HSC je u dvoudenního intervalu patrný znatelný rozdíl v expresi proteinů v HSC na platu a na kolagenním gelu. Zatímco na platu je Bax exprimovaný pouze u 31 % buněk, s prodlužující se dobou kultivace jeho exprese roste na 49 %. Na kolagenu naopak klesá z 64 % na 43 %. Bcl-2 protein je na počátku na platu exprimován u 33 % buněk a s prodlužující se kultivací roste na 53 %. Na kolagenu lze sledovat opačný trend, klesá exprese z 63 % na 34 % (Obr. č. 4 B). Poměry se vzájemně s prodlužující se kultivací nemění tak markantně jako v případě N HSC. Na platu je změna poměru nepatrná, z 1,06 na 1,08 a na kolagenním gelu je pokles z 0,98 na 0,79. Platí, že čím je hladina apoptotického poměru Bcl-2/Bax vyšší, tím je nižší hladina spontánní apoptózy.

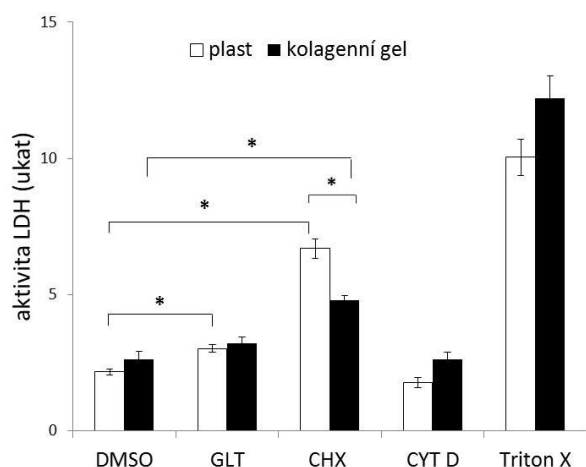
A			B		
Průkaz apoptotických proteinů N HSC			Průkaz apoptotických proteinů C3 HSC		
Bcl-2	Den 2	Den 6	Bcl-2	Den 2	Den 6
plast	17 ± 5	43 ± 6	plast	33 ± 2	53 ± 5
kolagenní gel	25 ± 7	66 ± 4*	kolagenní gel	63 ± 4 *	34 ± 10
Bax			Bax		
plast	41 ± 2	42 ± 2	plast	31 ± 3	49 ± 3
kolagenní gel	45 ± 4	70 ± 4*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

Obrázek č. 4: Imunofluorescenční detekce apoptotických proteinů Bcl-2 a Bax u N HSC a C3 HSC při dvou a šestidenní kultivaci. Buňky se na plastu postupně aktivují a hladina α -SMA vzrůstá a dochází ke změnám v hladinách Bcl-2 i Bax na obou površích. Statistická významnost (*) byla ověřena Studentovým t-testem ($p \leq 0.05$) ze čtyř měření.

6.3. Vliv kolagenního gelu na apoptózu vyvolanou pomocí toxinů

Předchozí výsledky naznačují, že kolagenní gel může potencovat rozvoj dějů, které vedou k řízené apoptotické smrti HSC. Snažili jsme se toto tvrzení ověřit i na standardních modelech, používaných k navození apoptózy a to pomocí tří různých toxinů – gliotoxinu, cykloheximidu a cytochalasinu D. Působení toxinů jsme vystavili aktivované sedmidenní HSC kultivované na plastu a na kolagenních gelech. Jako kontrola bylo do média přidáno místo toxinu rozpouštědlo DMSO v koncentraci 1 %. Každý z použitých toxinů má jiný mechanismus účinku pro vyvolání apoptózy a způsobuje ji v různých časových obdobích.

Hypotézu, že působením toxinů nedochází k nekróze buněk, ale k iniciaci apoptózy, jsme vyloučili sledováním aktivity laktátdehydrogenázy. Hladina LDH jako parametru buněčného poškození byla oproti pozitivní kontrole (totálně zničené buňky pomocí Tritonu X) srovnatelná s kontrolou (DMSO). Statisticky významné byly výsledky srovnání buněk po působení vlivu CHX vůči kontrolním buňkám, u kterých předpokládáme částečný vliv toxického účinku. Lze zde sledovat i rozdíl mezi kolagenním gelem a plastem. Ostatní výsledky vykazují nízkou hladinu poškození buněk a poměrově jsou srovnatelné s kontrolou (Graf č. 3).

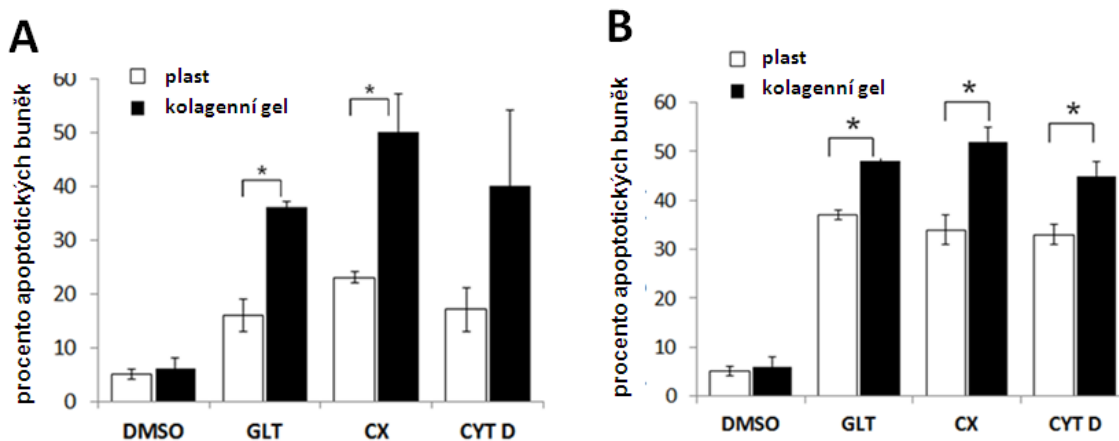


Graf č. 3: Analýza aktivity uvolněné LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) do média po působení toxinů na N HSC 7 dní. Hodnoty jsou zobrazeny jako aktivity LDH v médiu. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměru ($n = 4$). Statistická významnost (*) ověřena Studentových t-testem ($p \leq 0.05$).

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

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

Obdobného výsledku, že kolagenní gel potencuje, podporuje a výrazně zvyšuje apoptózu HSC, jsme dosáhli i u obou dalších toxinů (Graf č. 9). CHX způsobuje na kaspázách závislou apoptózu v koncentracích od 50 do 200 μM po dobu 14 až 24 hod (Lee, 2011). Po vyzkoušení různých kombinací dle literatury jsme vybrali jako optimální 75 μM po dobu 14 hodin, při kterých došlo k výraznému útlumu životaschopnosti buněk. CYT D narušuje aktinová mikrofilamenta v buňkách a aktivuje tak cestu p53 vedoucí k apoptóze (Preaux, 2002). CYT D navozuje apoptózu nejmaleji ze všech zkoušených toxinů v koncentraci 5 μg/ml (0.01 μM) po dobu 24 hodin, morfologické změny jsou vidět již velice brzy. Pro větší přehlednost grafu je statistická významnost uvedena jen pro srovnání plastu a kolagenního gelu v rámci jednotlivých toxinů, neboť vůči DMSO jsou všechny výsledky významně statisticky zvýšené.



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

7. DISKUSE

HSC plní v játrech celou řadu funkcí, mají nezastupitelnou roli při hospodaření s vitamínem A a při remodelaci poškozených jater. Mohou přecházet z klidového stadia do aktivované formy podobné myofibroblastům. Přechod je doprovázen řadou rozsáhlých změn, a to v morfologii, genové expresi i ve fenotypu. Předpokladem reverzibility jaterní fibrózy je eliminace buněk odpovědných za produkci extracelulární matrix tak, aby převážily resorptivní proteolytické procesy. S narůstajícími znalostmi o programované buněčné smrti HSC v souvislosti s regresí fibrózy se vynořují otázky o možnostech jejího ovlivnění.

Jelikož se ve většině studií zkoumají buňky izolované z nepoškozených jater a zřídka se izolují a kultivují již *in vivo* aktivované HSC z akutně poškozených jater, rozhodli jsme se zjistit, jak se mění exprese genů úzce souvisejících s metabolismem ECM během aktivace C3 HSC v játrech toxicky zasažených CCl₄. Aktivované HSC (C3 HSC) jsme izolovali z jater po akutním toxickém poškození, pro srovnání jsme použili buňky izolované z nepoškozených jater. Intražastrické podávání CCl₄ a jeho metabolismus způsobuje vznik volných radikálů, poškozuje hepatocyty a stimuluje proces aktivace HSC *in vivo*. Již na histologických preparátech obou typů jaterních tkání byl vidět zásadní rozdíl, u toxicky poškozených jater došlo k přestavbě jaterního parenchymu a bylo patrné vyšší množství ECM, zejména retikulárních a kolagenních vláken.

Prostřednictvím oligo cDNA mikroarrayí jsme sledovali změny v expresi genů v buňkách C3 HSC 2 dny po izolaci a srovnávali jsme je se stavem v buňkách N HSC. Sledované geny v počtu 94 jsme rozdělili do 5 skupin. V úvahu jsme brali jen ty geny, u nichž byla intenzita signálu po normalizaci vyšší než 0,2. Stanovení jsme opakovali 4x, takže v jednotlivých skupinách genů se objevily zřetelné tendence, i když výsledky nebyly vzhledem k rozptylu hodnot statisticky významné. Naším cílem bylo popsat jaké změny u genů ze skupin strukturálních proteinů ECM, matricelulárních proteinů, chemokinů, metaloproteáz a jejich inhibitorů, buněčných receptorů a markerů HSC, a apoptotických genů jsou charakteristické pro časnou aktivaci C3 HSC. Výběr zastoupených genů vycházel z podrobné rešeršní práce školitele.

U C3 HSC jsme zaznamenali zvýšení exprese profibrogeních genů jako prokolagen typu I a III a signifikantní nárůst fibronektinu. Fibronektin se hromadí v časných fázích rozvoje fibrózy a předchází ukládání kolagenu. HSC jsou ve fibrotických játrech zdrojem nejen některých strukturálních proteinů zejména kolagenu typu I a III, ale i matricelulárních proteinů. Exprese Bgn a Lum byla u C3 HSC zvýšená. Matricelulární proteiny jsou proteoglykany bohaté na leucin (small leucine-rich proteoglycans SLRP). Ve své struktuře mají, jak název napovídá, proteinovou osu, ve které se často vyskytuje leucin. Na proteinové tělo se váží glykosaminoglykany. Jsou uloženy v těsné blízkosti buněk a jsou schopny vázat nejrůznější receptory, cytokiny a růstové faktory a strukturální proteiny ECM zejména kolageny. Ovlivňují tak zejména proliferaci, přežití, adhezi a migraci buněk, tedy klíčové procesy nejen pro rozvoj fibrózy ale i pro šíření metastáz. Bgn pozitivně ovlivňuje fibrilogenezi kolagenu, vysoké hladiny obsahují například keloidy (Hunzelmann, 1996) a i fibrotická játra (Hogemann, 1997). Sérové hladiny Bgn (uvolněné po štěpení molekuly pomocí MMP9 a MMP12) pozitivně korelují s progresí fibrózy u zvířecích modelů (Genovese, 2013). Deficience Lum u knock-outovaných myší vedla ke snížené produkci kolagenu, díky snížené fibrilogenezi, zvýšeným odbouráváním pomocí MMP 13 i při zvýšeném počtu α SMA pozitivních buněk (Krishnan, 2012).

Při rozvoji fibrózy hrají důležitou roli integriny – transmembránové receptory, které interagují s fibrilami kolagenu i ostatními složkami ECM a ovlivňují tak další osud buňky (Imai, 2000). C3 HSC mají zvýšenou expresi $\alpha 6$ podjednotky integrinu, který slouží jako receptor pro laminin a $\beta 3$

podjednotky vázající vitronektin a trombospondin. V literatuře je popsána řada integrinů, které jsou exprimovány v HSC. Jedná se o heterodimery složené z řetězců α a β . Např. $\alpha_1\beta_1$ je receptorem pro kolagen typu IV a laminin, $\alpha_2\beta_1$ pro kolagen, laminin a fibronektin a dalších jako například $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_8\beta_1$ (Carloni, 1996). Nejznámějším integrinem, který se podílí na proliferaci a apoptotickém procesu a koreluje se stupněm jaterní fibrózy je integrin $\alpha_v\beta_3$ (Zhou, 2004). Vazba ligandu na integrin $\alpha_2\beta_1$ vede k indukci exprese MMP-9 v HSC kultivovaných v kolagenním gel.

Produkce ECM, TIMP a cytokinů je typická pro fibrózu. Důležitou roli tu hraje rovnováha mezi MMP a TIMP, její porušení předurčuje ukládání nebo lýzu ECM. U C3 HSC vidíme pokles exprese MMP a to MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-13. Naopak exprese MMP-2 je zvýšená, což může souviset s remodelací normální subendotelové matrix.

Kromě úlohy při vytváření matrix se HSC účastní regulace zánětlivých procesů během jaterního poškození. V C3 HSC jsme našli zvýšenou expresi NT-3, IL-4 a VEGF.

Po poškození hepatocytů dochází k významné produkci chemokinů jako TNF, TGF, IL6 a IL-10, které mají autokrinní vliv na aktivaci HSC (Rodelfeld, 2006). Destičky produkují PDGF. PDGF-receptor patří do skupiny tzv. tyrosinkináz, které jsou významné při přenosu signálů mnoha cytokinů do HSC (např. HGF – hepatocyte growth factor, EGF – epidermal growth factor, VEGF – vascular endothelial growth factor, FGF – fibroblast growth factor). Intracelulární cesty po aktivaci PDGF receptoru zahrnují ERK/MAP kinázu, PI-3-kinázu a STAT-1 (signal transducers and activators of transcription). PDGF ligand je nejsilnější mitogen hvězdicových buněk, mezi další mitogeny patří endotelin-1, FGF, IGF a jiné (Pinzani, 2002). Předpokládá se, že v iniciální fázi aktivace mají důležitou roli transkripční faktory jako NF κ B nebo PPAR γ , kterými je exprese dalších genů díky jejich interakci se specifickými nukleotidovými sekvencemi řízena. NF κ B podporuje přežití aktivovaných HSC a jejich proliferaci. NF κ B působí ochranně proti TNF-alfa indukované apoptóze HSC (Liu, 2004). NT-3 a receptory pro neurotrofin (rNT) jsou exprimovány i mimo nervovou tkáň a to zejména při remodelaci tkáně, souvisejí s proliferací a migrací buněk. Exprese byla nalezena v HSC (Cassiman, 2001). Neurotrofiny indukují expresi α -SMA, kolagenu I a TGF- β 1 v časně aktivovaných HSC, v plně aktivovaných HSC stimulují syntézu prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF α , SDF-1 a MCP-1 (Hubel, 2011).

Další skupinou sledovaných genů byly apoptické geny. Jednalo se například o protein p53 či p21, které hrají důležitou kontrolní roli v buněčném cyklu a potažmo i apoptotickém procesu, endogenní inhibitory kaspáz IAP či BIRC3 a iNOS (nitric oxide synthase), která je zapojená do dějů doprovázených působením TNF α a umožňuje tvorbu NO* radikálů (Binder, 1999). Předmětem našeho zájmu byla exprese dvou nejvýznamnějších členů apoptotické rodiny Bcl-2, antiapoptotického Bcl-2 a proapoptotického Bax, jejichž expresi jsme následně sledovali i na proteinové úrovni.

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

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

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

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

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

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

Jak bylo zmíněno, rozhodujícím činitelem pokračující či naopak ustupující fibrogeneze je výsledný stav počtu HSC, který vychází z poměru intenzity protichůdných procesů, kterými jsou proliferace a programovaná smrt HSC (Zhou, 2004). Jelikož se během kultivace v kolagenním gelu snížil jejich počet, vedlo nás toto zjištění k otázce, zda buňky vykazují apoptotický charakter. V našich pokusech byla apoptóza potvrzena dvěma nezávislými metodami – fluorescenčním barvením a za pomoci průtokové cytometrie. To nám umožnilo sledovat morfologii jaderných změn a strukturu chromatinu (AO,DAPI) kombinované s propustností buněčné membrány (EtBr), a analýzu buněčného cyklu včetně vyhodnocení zastoupení apoptotického subG1 peaku pomocí průtokové cytometrie.

Kombinace těchto metod nám poskytla přesnější náhled na průběh buněčných změn a ve všech případech jsme dosáhli shodného výsledku.

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

Ke stejným závěrům jsme došli také v případě apoptózy vyvolané pomocí toxinů *in vitro* s různým mechanismem spuštění apoptózy. Jedním z nejstudovanějších je gliotoxin, který se akumuluje v hepatocytech i v HSC. Ty jsou k jeho působení citlivější, dokáže navodit apoptózu již jednou dávkou a významně tak přispět k redukci fibrózy (Wright, 2001, Hagens, 2006).. Dalšími toxiny navozující apoptózu byly cykloheximid, inhibitor syntézy proteinů (Preaux, 2002) a cytochalasin D, který zasahuje do mechanismu aktinových filament (Murphy, 2002).. Zjistili jsme, že nezáleží na počátečním impulzu nebo na cestě, kterou probíhá, ale gel z kolagenu typu I ve všech případech podporoval a výrazně zvyšoval apoptózu HSC ve srovnání s kultivací na plastu. Proto se tyto látky jako gliotoxin a jemu podobné intenzivně zkoumají, abychom dovedli ovládnout převládající procesy v játrech a způsobit tak návrat do původního stavu (Hagens, 2006).

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

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

8. ZÁVĚR

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

Prokázali jsme, že se HSC, jež jsou hlavním zdrojem extracelulární matrix v játrech, kultivací na plastu aktivují, prolifерují a mění svůj fenotyp. Aktivované HSC se vyznačují pozitivitou alfa hladkosvalového aktinu způsobující jejich kontraktilní vlastnosti. Během aktivace dochází k řadě změn v expresi různých skupin genů, ty se exprimují v menší či větší míře např. byly zvýšeny exprese genů pro složky ECM (prokolagen typu I, III, fibronektin) a na druhé straně došlo k downregulaci některých genů, např. u řady metaloproteináz a syndecanu. Gel z kolagenu typu I, hlavní komponenta jaterní extracelulární matrix fibrotických sept a jeho trojrozměrná struktura ovlivňuje růst a proliferaci buněk a zároveň se významnou měrou podílí na dynamice apoptotického procesu. Na druhou stranu způsobuje také návrat části aktivovaných HSC zpět do klidového stavu, jak bylo prokázáno morfologicky i sníženou expresí alfa hladkosvalového aktinu. Nehledě na to, zdali byla apoptóza HSC indukovaná in vivo nebo in vitro použitím toxinů, a tudíž aniž by byl rozlišován původ jejího vzniku či mechanismus působení, gel z kolagenu typu I, anebo jeho degradace způsobená metaloproteinázami, apoptózu iniciuje, zintenzivňuje a urychluje. Významně ovlivňuje expresi důležitých pro- či anti-apoptotických členů Bcl-2 rodiny, mění apoptotický poměr Bcl2/Bax a tak ovlivňuje následný osud hvězdicových buněk v játrech. Interakce jaterních hvězdicových buněk v poškozených játrech se složkami extracelulární matrix hraje důležitou roli v návratu fibrotického poškození k původnímu stavu. Proč kolagen způsobuje akceleraci apoptózy, a jaký mechanismus to způsobuje, zatím není známo. Osud HSC lze ovlivnit na mnoha úrovních celou řadou intracelulárních či extracelulárních faktorů majících apoptotický vliv, což může ústít k reverzibilitě jaterní fibrózy.

Závěrem lze tedy říci, že nezáleží na tom, jakým způsobem byla apoptóza způsobena, ale kolagenní matrix, která se v játrech akumuluje při rozvoji jaterní fibrózy, tento proces urychluje a může velmi výrazně ovlivnit životní cyklus a chování jaterních hvězdicových buněk. Přestože je trojrozměrný gel bez přítomných ostatních buněk pro HSC zjevně stále uměle vytvořeným prostředím, předpokládáme, že naše studie pomohla získat lepší pohled na děje v játrech, zejména na apoptotické procesy.

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

9. LITERATURA

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

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

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.

Cassiman D, Deneef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33:148-58.

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

- Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, Moon YM. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39:960-6.
- Lee U, Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 195–206.
- Lui X-J, Yang, L, Lou F-M, Wu H-B, Qiang Q. Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1600–1607.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X. et al. : Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277:11069-76.
- Neubauber K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1996; 24:719-30.
- Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108:1369–1378.
- Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7:d1720-6.
- Preaux AM, D'Ortho MP, Bralet MP, Laperche Y, Mavier P. Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2. *Hepatology* 2002; 36:615-622.
- Příbramská V, Husová L, Jaterní cirhóza; *Interní Med* 2007; 9:486–489.
- Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grötzinger J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *Faseb J* 2006; 20:444-54
- Sato M, Suzuki S, Senoo H: Hepatic Stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and function* 2003; 28: 105-112.
- Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phosphate further modulates morphology, proliferation, and collagen synthesis of the perisinusoidal stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 999-1006.
- Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formation. *Kaibogaku Zasshi* 1994; 69:719-33.
- Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *Journal of hepatology* 2002; 37:214-221.
- Wells RG, The role of matrix stiffness in hepatic stellate cells activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:S158-61.
- Wright, M. C., Issa, R., Smart, D. E., Trim, N., Murray, G. I., Primrose, J. N., et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001; 121, 685–698.
- Wells RG, The role of matrix stiffness in hepatic stellate cells activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:S158-61.
- Zhou, X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24:492-501.

10. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Původní vědecké publikace

- **Bittnerova L, Jiroutova A, Rudolf E, Rezacova M, Kanta J. Effect of collagen I gel on apoptosis of rat hepatic stellate cells (Acta Medica, přijato k tisku v čísle 2/2013).**
- Jiroutova A, Peterova E, Bittnerová L, Slavkovsky R, Cevalová P, Rezacova M, Cerman J, Mícuda S, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. *Physiol Res* 2013; 62:15-25. (IF: 1.555)
- Jiroutova A, Slavkovsky R, Cermaková M, Majdiakova L, Hanovcova I, Bolehovska R, Ruzsova E, Kanta J.: Expression of connective tissue proteins in rat liver myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 58:263-73. (IF: 1.431)
- Jiroutová A, Majdiakova L, Cermakova M, Kohlerova R, Kanta J. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic liver. *Acta Med* 2005; 48:137-144.

Přehledové články

- **Bittnerova L. Je jaterní fibróza reverzibilní proces? Pracov. Léč. 2013; 65:48 – 52.**

Přednášky a poster

- Majdiaková L, Jiroutová A, Kanta J. Vliv kolagenu na apoptózu jaterních hvězdicových buněk. Májové hepatologické dny 2008, Karlovy Vary 14-16.5.2008 (přednáška)
- Majdiaková L, Jiroutová A, Kanta J. Vliv kolagenu na apoptózu jaterních hvězdicových buněk. 3. Fakultní konference studentů doktorského studia, 03.04.2006, Hradec Králové (přednáška)
- Majdiaková L, Jiroutová A, Slavkovsky R., Kanta J. Gene expression in activated hepatic stellate cells and myofibroblasts. The 15th Annual International Medical Student's Congress; Cairo, Egypt, 2007 (posterové sdělení). Sborník bez ISBN.
- Majdiaková L, Jiroutova A, Rezacova M, Kanta J. Effect of collagen type I gel on apoptosis of hepatic stellate cells; 3rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference Biochemistry of Cell Regulation Atheny 2008 (posterové sdělení) abstrakt uveřejněn v *FEBS Journal*, Vol. 275, Suppl. 1, June 2008, pp. 177, Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Jiroutova A, Cevalova P, Majdiakova L, Slavkovsky R, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. 34th FEBS Congress 2009, Praha (posterové sdělení) abstrakt uveřejněn v *The FEBS Journal*, Vol 276, Supplement no I (P4-55).
- Jiroutová A, Majdiaková L, Slavkovský R, Kanta J. Liver myofibroblasts: fibrogenic cell population. Setkání hepatol. spol., 2007, Hradec Králové (posterové sdělení).
- Jiroutová A, Majdiaková L, Slavkovský R, Kanta J. Effect of collagen type I gel and fibrin gel cultivation on gene expression in liver myofibroblasts. UEGW 2007 v Paříž (posterové sdělení) abstrakt uveřejněn v *Gut Supplement no III Vol 56 - Endoscopy Supplement no I Vol 39 (A263)*.
- Jiroutová A, Majdiaková L, Čermáková M, Kanta J. Expresse bílkovin cytoskeletu v jaterních hvězdicových buňkách izolovaných z normálních a cirhotických jater. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary 2005 (posterové sdělení).