

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 podáním 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.