

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



**Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů**

**Alena Jiroutová**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Lékařská chemie a biochemie**

**Hradec Králové**

**2011**

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. Alena Jiroutová  
Ústav lékařské biochemie

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

Oponenti: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.  
II. interní gastroenterologická a hepatologická klinika  
Fakultní nemocnice Olomouc

doc. Radislav Sedláček, Ph.D  
Oddělení transgenních modelů nemocí  
Ústav molekulární genetiky AV ČR

Tato práce vznikla za podpory grantů:

MSM 0021620820  
GAUK 86/2006/C/LFHK  
GAČR 305/03/1513

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. Martina Řezáčová, Ph.D  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

## OBSAH

1. SOUHRN.....	3
2. SUMMARY .....	4
3. ÚVOD .....	5
4. CÍLE PRÁCE .....	6
5. METODICKÁ ČÁST .....	7
5.1. Materiál a metody .....	7
5.2. Statistická analýza.....	7
5.3. Přístrojové vybavení .....	7
6. VÝSLEDKY .....	8
6.1. Exprese genů HSC a MF izolovaných z intaktních a cirhotických jater potkanů.....	9
6.1.1. Oligo cDNA array.....	9
6.1.2. Validace výsledků arrayí pomocí rt RT-PCR.....	9
6.1.3. Imunocytochemická detekce metaloproteinas u HSC .....	13
6.1.4. Inkorporace thymidinu – dělení buněk během pasáží.....	13
6.2. Ovlivnění MF kultivací ve fibrinovém a kolagenním gelu.....	13
6.2.1. Výsledky oligo cDNA arrayí MF ve fibrinovém a kolagenním gelu .....	13
6.2.2. Validace výsledků arrayí pomocí real-time RT-PCR .....	13
6.2.3. Imunocytochemický průkaz metaloproteinas MF v gelech.....	15
6.2.4. Měření úbytku hmoty gelů.....	15
7. DISKUSE .....	16
7.1. Imunohistochemická a imunocytochemická charakterizace HSC a MF .....	16
7.2. Změny v expresi genů spojené s aktivací HSC.....	16
7.3. Vliv kolagenního a fibrinového gelu na expresi genů MF .....	18
8. SHRUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ .....	20
9. ZÁVĚR.....	21
10. LITERATURA .....	22
11. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ .....	25

## 1. SOUHRN

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

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

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

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

Přítomnost gelů měl vliv jak na morfologii, tak na expresi genů MF. Ovlivněna byla exprese cytokinů IL-6, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, CTGF a metaloproteinasy, matricelulárních proteinů trombospondinu-2 a osteopontinu. Zvýšila se exprese MMP-3, 9, 13 a 14, exprese inhibitoru aktivátoru plasminogenu se snížila. Změny v expresi byly výraznější u kolagenního gelu. MF měly schopnost solubilizovat až polovinu hmoty gelů.

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

## 2. SUMMARY

Hepatic stellate cells (HSC) and liver myofibroblasts (MF) are two cell populations most likely responsible for the synthesis of majority of connective tissue components in fibrotic liver. They differ in their origin and location in the liver, and in the spectrum of genes they express. HSC are located in Disse spaces of normal rat liver around the sinusoids, in fibrotic liver they become activated, proliferate and they undergo transdifferentiation into myofibroblast-like cells. Myofibroblasts are heterogenous cell population that consists at least of portal pMF, septal sMF and interface iMF. pMF, which are adjacent to bile duct epithelia, may be a mediator of biliary type fibrosis. sMF are located within and along the collagenous septum in cirrhotic liver. Little is known about the expression of genes involved in connective tissue metabolism in MF cultured in fibrin or collagen gels that more closely resemble natural cell environment. Fibrin is deposited in liver at sites of injury and collagen type I forms a substantial part of fibrotic septa.

In our study oligo cDNA array analysis was used to determine gene expression in quiescent HSC, activated HSC and MF isolated from both normal and CCl<sub>4</sub>-cirrhotic liver. The expression of genes coding for connective tissue proteins, proteoglycans, metalloproteinases and their inhibitors, growth factors and cellular markers was determined. We investigated the influence of extracellular matrix environment on gene expression in MF.

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 from normal liver 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 MF. Both cell subpopulation HSC and MF were stained for expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and intermediate filament proteins vimentin, desmin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) using immunocytochemistry. Expression of genes was studied oligo cDNA array, rt RT-PCR. Expression of some proteins was studied by immunofluorescence. The extent of gel digestion by the cells was measured.

The pattern of gene expression changed during HSC activation, there were distinct differences between HSC and MF. Activated HSC express more collagen type I, III, IV, perlecan, fibronectin, osteopontin than freshly isolated HSC. Expression of metalloproteinases (MMP) decreases with activation. Gene expression of HSC isolated from cirrhotic liver resemble expression of HSC activated in vitro by cultivation on plastic dishes. There was no difference between normal MF and those isolated from the cirrhotic liver. The spectrum of cytoskeletal proteins was changing during cultivation of HSC. HSC differ from MF by presence of desmin. GFAP could be detected only in normal cells 2 days after their isolation. In contrast,  $\alpha$ -SMA was absent from normal cells at this time but its expression was pronounced later. Embedding MF in collagen gel resulted in pronounced morphological changes of the cells. mRNA expression of a group of metalloproteinase (MMP-2, -3, -9, -13, -14) increased, while that of plasminogen activator inhibitor decreased. Significant changes in the expression of cytokines IL-6, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 and CTGF were found. The effects of fibrin gels on MF were milder than those of collagen. Protein expression paralleled changes in MMP mRNA. MF have the ability to solubilise about half of collagen gel body.

We conclude that MF and HSC are distinct cell populations. There was no difference between normal MF and those isolated from the cirrhotic liver. We found that embedding of cells in fibrin and collagen gel affected cell morphology and gene expression. Expression of matricellular proteins and cytokines important in scar tissue formation changed. Elevated expression of MMPs resulted in solubilization of gelous matrix.

### 3. 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, ECM) a poruchy mikrocirkulace. Změny fenotypu hvězdicových buněk (HSC) a aktivace ostatních typů myofibroblastů (MF) je klíčová při rozvoji jaterní fibrózy, umožňuje kvantitativní i kvalitativní přestavbu normální extracelulární matrix. HSC se nacházejí v Disseho prostoru, jejich hlavním úkolem ve zdravých játrech je skladovat vitamín A. Při poškození jater se hvězdicové buňky aktivují a dochází ke změně jejich fenotypu a přeměně na fibrogenní kontraktilní proliferující buňky. MF jsou heterogenní skupina buněk, byly popsány portální MF, septální MF a interface MF. V portobiliárním prostoru jaterního lalůčku se nacházejí pMF, které se aktivují při ischemii a městnání žluči; sMF se nacházejí uvnitř vazivových sept.

Na počátku fibrogenese je nekróza nebo apoptóza hepatocytů různé etiologie, následná fagocytóza apoptických fragmentů Kupfferovými buňkami vede k produkci chemokinů a cytokinů. Rozvíjí se zánětlivá reakce. HSC se aktivují, spolu s myofibroblasty MF endotelovými buňkami, což vede k produkci, cytokinů růstových faktorů, metaloproteinas (MMP) schopných degradovat složky bazální membrány. Tím se usnadní přístup k poškozené tkáni k fagocytujícím makrofágům a neutrofilním granulocytům. Poškozená tkáň se nahrazuje, 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.

Jaterní extracelulární matrix je komplikovanou strukturou makromolekul, která podléhá remodelaci během růstu a poškození jater. Normální i patologický ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty (glykoproteiny a proteoglykany). Hlavním nesolubilním fibrózním proteinem v tkáních je kolagen. Nekolagenní komponenty extracelulárního matrixu lze rozdělit na proteoglykany (heparan, dermatan, chondroitin sulfát), glykoproteiny (fibronectin, laminin, tenascin) a kyselinu hyaluronovou. Jaterní ECM nejen tvoří nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně, ale poskytuje také mnoho signálů přítomným buňkám (hepatocytům, zánětlivým buňkám apod.) nutných k udržení polarita buňky, migraci, proliferaci a diferenciaci. Změny ve složení ECM ovlivňují chování všech typů jaterních buněk. Řada růstových faktorů se váže na ECM a uvolňuje se v případě poškození tkáně, čímž dále zesiluje fibrotizační pochody. Matrix také vytváří cesty pro migraci buněk. 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 zřejmě i hepatocyty.

V naší práci jsme se zaměřili na studium exprese genů HSC a MF. Podrobné studium chování HSC bylo umožněno po zavedení enzymatické perfúze jater, kdy dojde k rozrušení tkáně pronasou a kolagenasou, s následnou izolací HSC na hustotním gradientu. Všeobecně uznávaný model pro aktivaci HSC in vitro je kultivace na plastových Petriho miskách v mediu se sérem. Po několika dnech dochází k morfologickým a funkčním změnám nazývaným aktivace. MF lze vykultivovat opakovaným pasážováním neparenchymové buněčné frakce. 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, ale i trojrozměrná struktura a její mechanické vlastnosti. Z toho důvodu se řada studií zabývá vlivem kultivačního prostředí na chování buněk.

## 4. CÍLE PRÁCE

Cílem naší práce bylo:

1. Izolovat jaterní hvězdicové buňky a myofibroblasty z normálních a z cirhotických jater potkanů. Charakterizovat je podle exprese cytoskeletálních markerů.
2. Popsat změny v expresi genů provázející aktivaci jaterních hvězdicových buněk a jejich přeměnu na myofibroblasty. Porovnat expresi genů jaterních hvězdicových 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 jakých způsobem to ovlivní jejich fenotyp.

## 5. METODICKÁ ČÁST

### 5.1. Materiál a metody

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 h. Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab, Praha). Jaterní hvězdicové buňky jsme izolovali z normálních a cirhotických jater. Cirhóza byla navozena opakovaným podáváním tetrachlormethanu intragastricky. HSC byly izolovány na hustotním gradientu z jater po enzymatické perfuzi. Postup je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2005). Buňky byly kultivovány v médiu po dobu 2 a 7 dnů. MF byly získány opakovanou pasáží primární kultury. MF byly kultivovány v gelu připraveném z kolagenu typu I nebo fibrinu (Sigma), jednalo se o sendvičovou metodu kultivace. Kolagen typu I byl extrahován z ocasních šlach potkanů, postup vychází z metody Elsdala (1972). Výsledná koncentrace kolagenu v gelu byla 0,1 %. Fibrinové gely byly připraveny polymerací fibrinogenu, výsledná koncentrace byla 1 mg fibrinogenu/ml gelu. Po sedmi dnech jsme měřili úbytek hmoty gelů vážením sušiny gelů.

Měřili jsme inkorporace thymidinu značeného triciem do DNA dělicích se buněk. V hydrolyzátu jsme stanovili množství DNA (Burton, 1956) a specifickou aktivitu automatickým spektrometrem Beckman LS6000 LL (Beckman Coulter, Inc. USA).

Jaterní tkáň pro imunohistochemické vyšetření byla fixována formaldehydem a zalita do parafinových bločků. Histologické řezy připravovala paní laborantka Světlana Kopecká v laboratořích Neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Histologické řezy jsme obarvili hematoxylinem-eozinem a barvením dle Gömöriho. Pro imunohistochemickou detekci jsme preparáty barvili pomocí specifických protilátek na  $\alpha$ -SMA, desmin, vimentin a GFAP.

Z buněk jsme vyextrahovali RNA fenol-chloroformovou extrakcí (Chomczynski, 1987). MF kultivované na plastu a v gelech byly sklizeny bez použití enzymů a RNA izolována pomocí RNeasy mini kitu (Qiagen). Expresi genů jsme stanovovali pomocí oligo cDNA arrayí a pomocí real-time RT-PCR. Postup je podrobně popsán v naší publikaci (Jiroutová, 2007). Metodika array analýzy vychází z postupu doporučeného výrobcem (Bioscience, Jena). 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). Zpracování dat proběhlo pomocí programu Iconoclust (Clondiag). Výsledky exprese genů jsme normalizovali vztahením na všechny geny v souboru (Jiang, 2004). Změny v expresi vybraných genů jsme si ověřili pomocí real time RT-PCR analýzy. Používali jsme sondy a primery obsažené v Taqman gene expression assay, navržené firmou Applied Biosystems. Při stanovení jsme postupovali podle pokynů výrobce. Normalizaci výsledků pro specifické geny jsme provedli vztahením na 18s RNA.

### 5.2. 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.

### 5.3. 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 Dobrouč, 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.



## 6. VÝSLEDKY

Před zahájením perfúze jater jsme si povšimli viditelných rozdílů v morfolologii 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.

Histologické řezy jsme obarvili standardními histologickými barvenými, pomocí hematoxylinu – eosinu a van Giesonovým barvením. Dále jsme pomocí imunohistochemických barvení  $\alpha$  aktinu z hladkého svalu ( $\alpha$ -SMA), desminu, kyselého gliálního fibrilárního proteinu (GFAP) a vimentinu zviditelnili neparenchymové jaterní buňky – jaterní hvězdicové buňky a myofibroblasty. V histologickém obrazu cirhotických jater jsme našli steatózu hepatocytů a nodulární přestavbu jaterní tkáně s typickými regeneračními uzly obklopenými vazivovými septy. Hyperplastické uzly hepatocytů měly na rozdíl od normálních jaterních acinů nepravidelný průběh. Uzly byly odděleny různě silnými vazivovými septy s četnými krevními kapilárami, pakanálky a různě hojným kulatobuněčným infiltrátem.

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. Normální játra se barví pomocí protilátky proti  $\alpha$ -SMA pouze v oblasti portobiliárního prostoru, jedná se zřejmě o  $\alpha$ -SMA pozitivní, desmin pozitivní a GFAP negativní pMF. Klidové HSC  $\alpha$ -SMA neexprimují. Výskyt desmin pozitivních buněk jsme kromě portobiliárního prostoru (v pMF) zaznamenali výjimečně i v parenchymu v okolí sinusoid, jedná se zřejmě o subpopulaci HSC. HSC, které se nacházejí v prostoru mezi sinusoidami, lze prokázat ve zdravých i cirhotických játrech pomocí GFAP. Cirhotická játra jsou charakteristická jizvami s p,sMF pozitivními na  $\alpha$ -SMA, desmin a vimentin. Vimentin pozitivní buňky jsme našli v parenchymu mezi hepatocyty i v portobiliární oblasti zdravých jater. V cirhotických játrech v parenchymu mezi hepatocyty, 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. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 1.

	Normální játra		Cirhotická játra	
	HSC	pMF	HSC	p,sMF
$\alpha$ -SMA	-	+	+	+
DES	+/-	+/-	+	+
GFAP	+	-	+	-
VIM	+	+	+	+

**Tabulka č. 1: Výsledky imunohistochemie. Průkaz HSC a MF pomocí barvení na desmin,  $\alpha$ -SMA, GFAP a vimentin ve zdravých a cirhotických játrech.**

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. 2.

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

### **6.1. Expresí genů HSC a MF izolovaných z intaktních a 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 expresie vybraných genů v čase. A to u HSC z normálních i cirhotických jater 2 dny po vysazení na plastové kultivační misce, po 7 dnech kultivace a u MF po pěti pasážích.

#### **6.1.1. 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 expresie genů, jejichž intenzita byla vyšší než 0,2 alespoň u jednoho z intervalů, jsou uvedeny v tabulce č. 3. Pro celkový náhled na změny odehrávající se při aktivaci a kultivaci buněk je tabulka doplněna obrázkem s grafy (obrázek č. 1). Do grafů byla vynesena normalizovaná hodnota expresie jednotlivých genů. V případě naprosté shody expresie genů by u porovnávaných skupin buněk všechny body ležely na úhlopříčce.

#### **6.1.2. Validace výsledků arrayí pomocí rt RT-PCR**

Array v tomto metodickém provedení je metodou semikvantitativní, vyžaduje potvrzení výsledků ještě dalším postupem, nejlépe rtRT-PCR, tedy metodou, která je citlivější a přesnější s nesrovnatelně větším dynamickým potenciálem. Obě metody mají odlišný design sond pro daný gen a odlišné způsoby normalizace. Hodnoty expresie získané rtRT-PCR jsme normalizovali na provozní gen 18s mRNA, kdežto oligo cDNA array využívala normalizace expresie genů tak, aby průměr intenzity zabarvení všech spotů, na každém čipu byl roven 1 (Jiang, 2004).

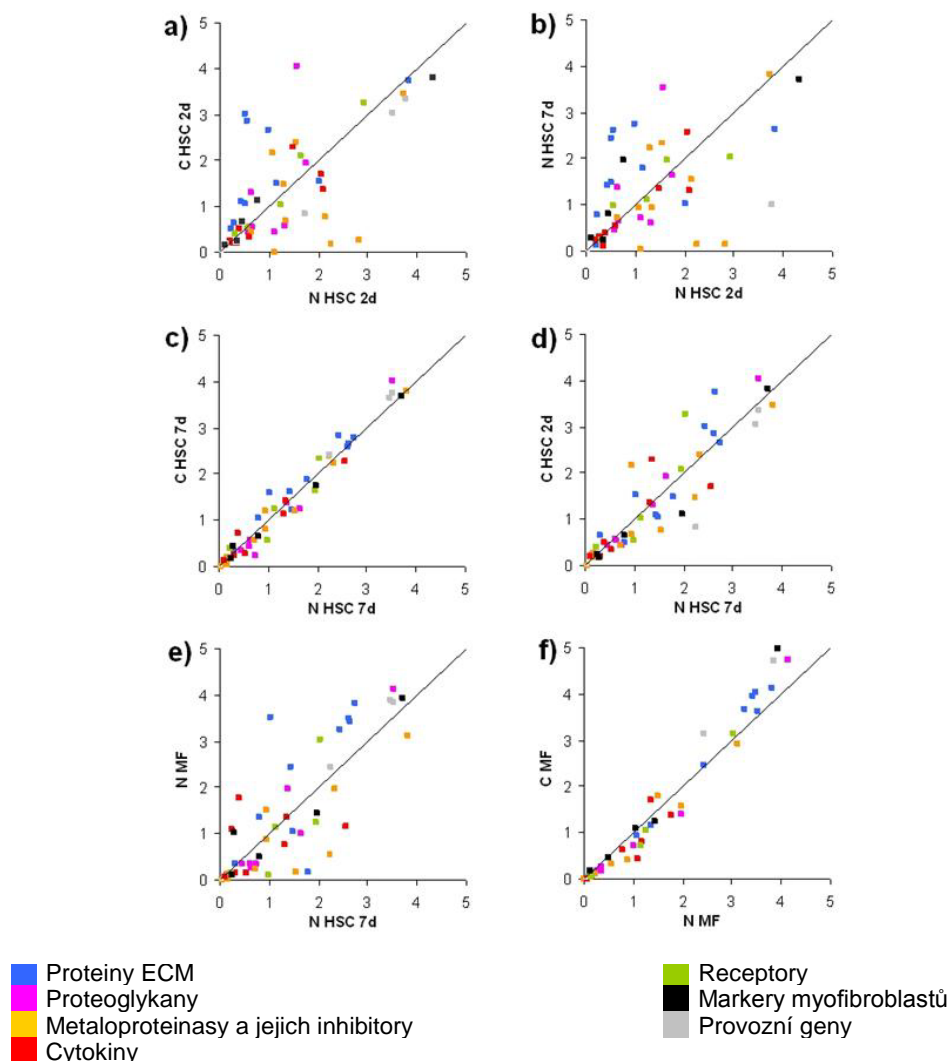
Pro validaci výsledků jsme vybrali 5 ze 49 genů z různých skupin a to proteiny ECM, MMP, buněčné markery a cytokiny. Výsledky normalizovaných hodnot expresie genů získaných metodou rtRT PCR jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Při porovnání obou metody měření expresie genů jsme zjistili, že u všech sledovaných genů (s výjimkou Ctgf při porovnání N HSC 7d/2d) výsledky rtRT-PCR potvrdily data získaná pomocí arrayí. Srovnání jsme provedli zhodnocením poměrů expresí jednotlivých genů u klidových HSCa aktivovaných HSC a klidových HSC a myofibroblastů.

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

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

Tabulka č. 3: Výsledky oligo cDNA arrayí. Normalizované hodnoty exprese genů v klidových HSC (2d), aktivovaných kulturách na plastru (7d), jaterních myofibroblastů z normálních jater (N MF) nebo cirhotických jater (C MF). V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky 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.



Obrázek 1: Výsledky oligo cDNA arrayí. 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	N-HSC 7d	N-MF
<b>Prokolagen typ I</b>	1.75 ± 0.54	35.15 ± 9.84 <sup>a</sup>	18.64 ± 2.5
<b>MMP13</b>	886.64 ± 439.54	0.42 ± 0.24	0.1 ± 0.07 <sup>b</sup>
<b>TGFβ1</b>	5.15 ± 0.54	1.77 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.07 <sup>b</sup>
<b>CTGF</b>	4.27 ± 1.28	3.15 ± 0.83	8.85 ± 1.21 <sup>c</sup>
<b>Desmin</b>	179.13 ± 59.63	170.04 ± 19.6	13.53 ± 8.48 <sup>b,c</sup>

Tabulka č. 4: Výsledky normalizovaných hodnot exprese genů získaných metodou rt RT-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).

### **6.1.3. Imunocytochemická detekce metaloproteinů u HSC**

Jak ukázaly předchozí výsledky, exprese MMP-2, 9, 13 je v HSC izolovaných z normálních jater a kultivovaných 2dny na plastu vysoká. Po aktivaci HSC exprese MMP-9 a 13 klesá a exprese MMP-2 se nemění. Pomocí imunofluorescence 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.

### **6.1.4. Inkorporace thymidinu – dělení buněk během pasáží**

Pomocí měření inkorporace radioaktivního <sup>3</sup>H-thymidinu do buněčné DNA jsme sledovali rozdíly v míře syntézy DNA primární kultury HSC a MF po 1,3 a 5 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.

## **6.2. 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. 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.

MF vysazené na plast jsou velké buňky polygonálního tvaru s viditelnými stresovými vlákny, které jsou po imunocytochemickém barvení pozitivní na hladkosvalový alfa aktin. 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.

Pomocí měření inkorporace radioaktivního <sup>3</sup>H-thymidinu do buněčné DNA jsme nezjistili statisticky významné rozdíly v syntéze DNA u MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu v porovnání s plastem.

### **6.2.1. Výsledky oligo cDNA arrayů MF ve fibrinovém a kolagenním gelu**

Pomocí oligo cDNA arrayů jsme porovnávali expresi genů souvisejících s metabolismem pojivové tkáně. Výsledné hodnoty relativní exprese genů jsou uvedeny v tabulce č. 5. Exprese genů na plastu byla hodnocena jako 100%. Pro statistické vyhodnocení byly opět zařazeny pouze geny, jejichž intenzita signálu po normalizaci byla vyšší než 0,2.

### **6.2.2. Validace výsledků arrayů pomocí real-time RT-PCR**

Pro validaci výsledků oligo cDNA arrayů 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. 6. Jedná se o průměry ze šesti pokusů, výsledky jsou uvedeny v procentech vztažených vždy na kontrolní buňky vysazené na plast.

Při kultivaci buněk ve fibrinovém gelu se proti MF na plastu signifikantně snížila exprese metaloproteinů MMP-7 a MMP-9 a také jejich inhibitoru PAI-1. Snížila se exprese TGF-β2 a osteopontinu. Kolagenní gel měl na expresi genů výraznější vliv. Došlo ke dramatickému zvýšení exprese metaloproteinů MMP-3 a MMP-13, ovšem s vysokou směrodatnou odchylkou mezi jednotlivými pokusy. Rovněž exprese MMP-2 a MMP-14 se zvýšila.

	Fibrinový	Kolagenní		Fibrinový	Kolagenní
<b>Proteiny ECM</b>			<b>Cytokiny a růstové faktory</b>		
Prokolagen (I) $\alpha 2$	113 $\pm$ 4	109 $\pm$ 4	BMP4	115 $\pm$ 3 *	107 $\pm$ 7
Prokolagen (III) $\alpha 1$	115 $\pm$ 5	106 $\pm$ 7	CTGF	87 $\pm$ 11	84 $\pm$ 5
Prokolagen (IV) $\alpha 1$	101 $\pm$ 6	79 $\pm$ 6 *	FGF2	86 $\pm$ 17	97 $\pm$ 4
Prokolagen (V) $\alpha 3$	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 *
Fibronectin	109 $\pm$ 6	109 $\pm$ 5	IL-6	97 $\pm$ 10	135 $\pm$ 39
Laminin b1	202 $\pm$ 115	215 $\pm$ 96	PDGF $\alpha$	67 $\pm$ 8 *	106 $\pm$ 8
Laminin c1	79 $\pm$ 17	105 $\pm$ 23	PDGF $\beta$	101 $\pm$ 8	115 $\pm$ 2 *
Galektin 1	105 $\pm$ 6	110 $\pm$ 3 *	TGF $\beta 1$	63 $\pm$ 12	143 $\pm$ 19
Galektin 3	98 $\pm$ 9	113 $\pm$ 2 *	TGF $\beta 2$	98 $\pm$ 2	94 $\pm$ 3
Osteonektin	117 $\pm$ 4 *	112 $\pm$ 9	TGF $\beta 3$	82 $\pm$ 8	63 $\pm$ 5 *
Osteopontin	79 $\pm$ 6 *	119 $\pm$ 17	TNF $\alpha$	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	<b>Receptory</b>		
Vitronectin	97 $\pm$ 12	104 $\pm$ 5	Integrin $\alpha 5$	116 $\pm$ 5	110 $\pm$ 6
<b>Proteoglykany</b>			Integrin $\alpha 6$	102 $\pm$ 9	83 $\pm$ 3 *
Betaglykan	94 $\pm$ 8	101 $\pm$ 3	Integrin $\alpha 8$	60 $\pm$ 7 *	58 $\pm$ 6 *
Biglykan	105 $\pm$ 6	112 $\pm$ 4	Integrin $\beta 1$	95 $\pm$ 10	101 $\pm$ 3
Perlekan	125 $\pm$ 4 *	118 $\pm$ 12	Integrin $\beta 3$	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
<b>Metaloproteinasy</b>			N-CAM	106 $\pm$ 8	102 $\pm$ 6
MMP-2	105 $\pm$ 9	100 $\pm$ 5	<b>Buněčné markery</b>		
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*	<b>Provozní geny</b>		
<b>Inhibitory metaloproteinasy</b>			Aktin b	114 $\pm$ 3	105 $\pm$ 9
$\alpha 2$ 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. 5: Výsledky oligo cDNA arrayí MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu. Expresí genů na plastru byla hodnocena jako 100%. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky průměru čtyř měření. \* značí statistickou významnost v porovnání s expresí na plastru ( $p < 0.05$ )**

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 plastru.

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.

Při porovnání obou metod měření exprese genů jsme zjistili, že obě metody prokázaly shodně zvýšení či snížení jednotlivých genů, opět se ukázala vyšší citlivost rtRT-PCR.

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

Tabulka č. 6: Výsledky oligo cDNA arrayí MF kultivovaných ve fibrinovém a kolagenním gelu po dobu 5 dnů. Expresí genů na platu byla hodnocena jako 100%. V tabulce jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky průměru ze šesti měření. Statistická významnost: a značí porovnání gelů a platu ( $p < 0.05$ ), b porovnání fibrinového gelu vůči kolagennímu gelu ( $p < 0.05$ )

### 6.2.3. Imunocytochemický průkaz metaloproteinasy 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 metaloproteinasy MMP-2, 3, 9, 13 v kolagenním a fibrinovém gelu a na platu. Analýzu jsme doplnili o barvení na  $\alpha$ -SMA, abychom zviditelnili tvar buněk. Buňky na platu nebyly pozitivní na žádnou ze zvolených metaloproteinasy. 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 metaloproteinasy.

### 6.2.4. 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.



## 7. DISKUSE

Na našem pracovišti se dlouhodobě zabýváme chováním buněk v normálních a patologicky změněných játrech. Má práce se zaměřila na hvězdicové jaterní buňky a transdiferenciací vzniklé myofibroblasty a jejich aktivaci in vitro a in vivo v normálních a cirhotických játrech. Naším cílem bylo popsat změny v expresi genů provázející aktivaci HSC in vitro a in vivo. Předcházela tomu identifikace a charakterizace izolovaných buněk pomocí známých markerů imunocytochemicky a histologický rozbor jaterní tkáně. Z literatury je známo, že změny v zastoupení složek extracelulární matrix, především kolagen typu I, významně ovlivňují chování HSC. My jsme do této diskuse chtěli přispět doposud nesledovaným působením kolagenního a fibrinového gelu na myofibroblasty.

### 7.1. Imunohistochemická a imunocytochemická charakterizace HSC a MF

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). Zjistili jsme, že pouze buněčná kultura klidových HSC obsahovala buňky pozitivní na GFAP, HSC po aktivaci obsahují  $\alpha$ -SMA a většinou i desmin. MF exprimují také  $\alpha$ -SMA ale desmin jim chybí. Tato zjištění byla v souladu s pracemi Knittela (1999), Ogawy (2007).

Pomocí imunohistochemického barvení jsme ve zdravých játrech detekovali portální MF, lokalizované v portobiliárním prostoru. pMF jsou buňky  $\alpha$  SMA a desmin pozitivní, ale GFAP negativní. Hvězdicové buňky se nacházejí v prostoru mezi sinusoidami. Narozdíl od pMF jsou GFAP pozitivní,  $\alpha$  SMA 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  $\alpha$ -SMA a desmin. HSC/MF se liší od pMF obsahem GFAP. 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.

### 7.2. Změny v expresi genů spojené s aktivací HSC

HSC a MF jsou označovány za hlavní producenty ECM v játrech. Aktivaci HSC a MF ať 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  $\text{CCl}_4$ . 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 proteinů ECM jsme prokázali také v MF podobně jako Bauer (2001). Expese 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.

Z literatury je známo, že právě růstové faktory jako jsou TGF $\beta$ 1, PDGF $\beta$  a IGF patří mezi klíčové cytokiny fibrózy jater (Bissell, 2001). V naší práci jsme nezaznamenali rozdíly v expresi TGF $\beta$ 1, PDGF $\beta$ , 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 $\beta$  se váže na buněčné receptory (TGFR), indukuje expresi řady genů jako např. fibrilárních kolagenů, fibronektinu, tenascin, membránových proteoglykanů (perlekanu, biglykanu). Negativně zasahuje do odbourávání ECM tím, že indukuje syntézu TIMP-1 a PAI-1 (Wells, 2000). Byla popsána vyšší exprese TGF $\beta$ 1 a jeho receptorů (TGFRI, II, III) v aktivovaných HSC. V myofibroblastech však schopnost receptorů vázat TGF $\beta$ 1 klesá, což může znamenat, že exprese kolagenu typu I je v MF nezávislá na TGF $\beta$ 1, jak navrhuje Dooley (2000). Se signalizací TGF $\beta$  úzce souvisí přítomnost betaglykanu, slouží jako koreceptor TGFRII. 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. Exprese betaglykanu se snižuje během transdiferenciace HSC na MF (Dooley, 2000).

Expresí CTGF měla opačný trend než TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1, v HSC tomu tak není (Gressner, 2007). CTGF stimuluje migraci, proliferaci a syntézu kolagenu v HSC (Paradis, 2002).

HSC a MF se lišili expresí matricelulárních proteinů - osteopontinu, trombospondinu. MF v porovnání s HSC více exprimují trombospondin-1. Tento glykoprotein interagující s povrchovými receptory buněk, je schopen aktivovat TGF $\beta$ 1 (Chen, 2000; Breitkopf, 2005). Naopak osteopontin ve zvýšené míře exprimovaly HSC ve srovnání s MF. Jde o glykoprotein, který zasahuje do procesů jako je buněčná adheze, migrace, proliferace a působí jako prozánětlivý cytokin (Tokairin, 2008). Exprese osteopontinu v játrech roste po toxickém poškození a in vitro aktivací HSC na plastiku (Lee, 2004).

Pozorovali jsme snížení hladiny mRNA Syndekanu-4-transmembránového proteoglykanu (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. Sdc 4 je totiž schopen vázat růstové Spp (Kon, 2008). U ostatních sledovaných syndekanů jsme změnu exprese nezaznamenali. Perlekan, další z proteoglykanů, byl silně exprimován v aktivovaných HSC i MF.

MF se liší od HSC smíženou 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.

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 nedetekovatelné míry. Hladina mRNA pro MMP-2 se s aktivací HSC na plastu 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.

Souhrnem můžeme konstatovat, že klidové HSC mají fenotyp podporující degradaci ECM, což je v souladu s pracemi Vyase, 1995; Iredala, 1996; Knittela, 1999. 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. Exprese 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 arayı 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.

### **7.3. 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.

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. Zaujal nás opačný trend v expresi osteopontinu na kolagenním a fibrinovém gelu. 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). TSP-2 působí dle literatury opačným efektem než osteopontin, Exprese trombospondinu (TSP-2) v MF na kolagenním gelu klesla. TSP-2 je považován za negativní endogenní regulátor angiogeneze a tumorigeneze. TSP-2 je důležitý pro správné formování kolagenních fibril typu I v kůži (Bornstein, 2004). Snížená exprese TSP-2 zvyšuje aktivitu MMP-2 in vitro i vivo.

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 NFκB nebo jiné transkripční faktory bude nutné v budoucnosti osvětlit. Ačkoli PAI-1 také patří mezi geny, jejichž exprese může být stimulována NFκB, MF v gelech exprimovaly méně mRNA pro PAI 1 v porovnání s buňkami na platu. Plasmin, jehož produkce je závislá na aktivátoru plasminogenu u-PA a jeho inhibitory 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.

Hmota fibrinových a kolagenních gelů byla po týdnu solubilizována z jedné šestiny resp. jedné poloviny, což dokládá aktivaci metaloproteinás 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 traslokaci p50, podjednotky transkripčního faktoru NFκB, do jádra (Xu, 1998).

Expresí 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).

## 8. 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 převládnou. MF a HSC se liší morfologicky i při imunocytochemickém barvení, HSC dávají pozitivní reakci na desmin, MF jsou desmin-negativní.

HSC aktivované kultivací na plastu ve srovnání s klidovými HSC exprimovaly ve větší míře geny pro složky extracelulární matrix (kolageny typu I, III a V), perlekan, fibronektin a osteopontin. Naopak nižší exprese byla patrná především u metaloproteas (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 plastu. 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 (fibronektinu, osteopontinu, kolagenu I, vitronektinu, osteonektinu) byla v MF vyšší, exprese metaloproteas (MMP-7, 12) naopak nižší. Souvisí to možná s rozdílnou expresí cytokinů (CTGF, PDGF- $\beta$ ). 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 metaloproteas, 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 fibrogenesí.

## 9. 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  $\alpha$ -SMA a profibrogenním fenotypem – vysokou expresí strukturálních proteinů ECM s převahou kolagenu typu I a III a nízkou expresí enzymů schopných degradovat ECM - metaloproteas. 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 absence specifického markeru, nejednotnost izolačních technik a jejich heterogenita. Analýza genové exprese ukazuje, že jde o buňky s fenotypem, který může podporovat fibrogenezi, 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 metaloproteas 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.

## 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*. 2001;20: 296-304
2. Bauer M, Schuppan D. TGFβ1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett*. 2001; 502:1-3
3. 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
4. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology*. 2001; 34: 859-6
5. 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.
6. Breitkopf K, Switza 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
7. 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
8. 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
9. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 1972; 54: 626-37
10. 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
11. 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
12. 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
13. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol*. 2000; 19: 597-614
14. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156-9
15. 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
16. 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
17. Iredale JP. Matrix turnover in fibrogenesis. *Hepatogastroenterology*. 1996; 43:56-7
18. 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)

19. Jiroutova A, Slavkovsky R, Cermakova M, Majdiakova L, Hanovcova I, Bolehovska R, Hajzlerova M, Radilova H, Ruzsova 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
20. 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 CCl(4)-cirrhotic rats. *Liver.* 2002; 22: 220-7
21. 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
22. 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.
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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
30. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis.* 1990; 10: 1-10
31. 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
32. 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
33. 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



34. 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
35. 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
36. 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
37. Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: G845-50
38. Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39: S158-61
39. 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
40. 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. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### Původní vědecké publikace

Muthna D, Soukup T, Jirina V, Mokry J, Cmielova J, Visek B, Jiroutova A, Havelek R, Suchanek J, Filip S, English D, Rezacova M. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest and Senescence but not Apoptosis. *Stem Cells Dev.* 2010; 19: 1855-62 (IF: 4.146)

Slavkovsky R, Kohlerova R, Jiroutova A, Hajzlerova M, Sobotka L, Cermakova E, Kanta J. Effects of hyaluronan and iodine on wound contraction and granulation tissue formation in rat skin wounds. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35: 373-9 (IF: 1.55 )

**Jiroutová A, Slavkovský R, Čermáková M, Majdiaková L, Hanovcová I, Bolehovská R, Ruszová E, Kanta J.: Expression of connective tissue proteins in rat liver myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol.* 2007; 58, 263-73 (IF: 1.431)**

**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**

### Přednášky a poster

Jiroutová A., Čevelová P., Majdiaková L, Slavkovský R., Cerman J., Mičuda S., Kanta J. Kolagenolytický potenciál potkaních jaterních myofibroblastů, 468. Plenární zasedání ČLS JEP 6.5. 2009, Hradec Králové (přednáška)

Jiroutová A, Slavkovský R, Majdiaková L, Kanta J. Vliv kultivace v kolagenním a fibrinovém gelu na jaterní myofibroblasty. Májové hepatologické dny 2008, Karlovy Vary 14-16.5.2008. (přednáška)

Jiroutová A., Majdiaková L., Hajzlerová M., Kanta J: Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů. Vědecká konference LF UK a FN HK, 22.1.2008 (přednáška)

Jiroutová A., Majdiaková L., Slavkovský R., Kanta J. Effect of collagen type I gel and fibrin gel cultivation on gene expression in liver myofibroblasts. 4th International Conference of Postgraduate Medical Students, 29.11-1.12.2007, Hradec Králové (přednáška)

Jiroutová A., Majdiaková L., Slavkovský R., Kanta J. Effect of collagen type I gel and fibrin gel cultivation on gene expression in liver myofibroblasts. 3. Fakultní konference studentů doktorského studia, 22.10.2007, Hradec Králové (přednáška)

Jiroutová A., Čevelová P., Majdiaková L., Slavkovský R., Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. 34th FEBS Congress, 4-9.7.2009, 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., 9.11.2007, 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 Paříži 27-31.10.07 (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. Expresie bílkovin cytoskeletu v jaterních hvězdicových buňkách izolovaných z normálních a cirhotických jater. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary 2005 (posterové sdělení)

### Původní vědecké publikace v recenzním řízení

**Jiroutova A, Majdiakova L, Slavkovsky R, Rezacova M, Cerman J, Micuda S, Kanta J. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. *Tissue Cell.***

Slavkovsky R., Kohlerova R., Tkacova V., Jiroutova A., Tahmazoglu B., Velebny V., Rezacova M., Sobotka L., Kanta J.: Zucker Diabetic Fatty rat - a new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. *Wound Repair Regen.*