

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

EXPRESE GENŮ V JATERNÍCH FIBROBLASTECH
KULTIVOVANÝCH V TROJROZMĚRNÉ MATRIX

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. PETRA ČEVELOVÁ

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

GENE EXPRESSION IN LIVER FIBROBLASTS
CULTURED IN THREE-DIMENSIONAL MATRIX

THESIS

Author:

Bc. PETRA ČEVELOVÁ

2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra ČEVELOVÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Expresse genů v jaterních fibroblastech kultivovaných v trojrozměrné matrix**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část: a) obecný úvod o jaterní fibróze a cirhóze
- b) rešerše o jaterních fibroblastických buňkách, které se podílejí na vzniku jaterní fibrózy a jejich ovlivnění některými růstovými faktory a farmaky
- c) přehled metod používaných při studiu jaterních fibroblastických buněk
- 2) Praktická část:
 - a) izolace a kultivace jaterních myfibroblastů
 - b) izolace celkové buněčné ribonukleové kyseliny (RNA)
 - c) elektroforéza RNA na agarózovém gelu, ověření její kvality
 - d) syntéza deoxyribonukleové kyseliny (DNA) komplementární k izolované RNA
 - e) analýza informační RNA (mRNA) metodou real time RT-PCR

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Alena Jiroutová

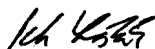
Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.5.2009

Petra Čevelová

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Kantovi, CSc. za odborné vedení a příležitost podílet se na výzkumu v dané oblasti. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Aleně Jiroutové za ochotnou pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala při řešení zadané problematiky. Mé díky patří také všem členům laboratoře za vytvoření ideálního prostředí pro experimentální práci.

Zvlášť bych pak chtěla poděkovat své rodině a přátelům za všestrannou podporu a hlavně rodičům, kteří mě psychicky a finančně podporovali v průběhu celého mého studia.

SOUHRN

Fibrotizační pochody v játrech jsou důsledkem aktivace určitých typů buněk – jaterních hvězdicových buněk (HSC) a jaterních myofibroblastů (MFB). V této práci jsme se zabývali vlivem kultivačního prostředí na expresi genů v jaterních MFB potkanů. Srovnávali jsme běžný způsob kultivace buněk na polystyrenových Petriho miskách s kultivací v trojrozměrném (3D) prostředí a sledovali vliv dvou rozdílných látek - růstového faktoru FGF-1 a WY-14643, ligandu receptorů PPAR α .

MFB byly izolovány opakovaným pasážováním z frakce neparenchymových jaterních buněk potkanů. Poté byly vysazeny na plast a do kolagenního, respektive fibrinového gelu. Do kultivačního média byly přidány sledované látky. Buňky byly sklizeny v různých časových intervalech. Poté z nich byla izolována celková RNA a syntetizována cDNA. Expze genů byla stanovena pomocí rtRT-PCR. Data byla statisticky zpracována pomocí Studentova t-testu ($p \leq 0,05$).

Naše práce ukázala, že růstový faktor FGF-1 a ligand PPAR α WY-14643 ovlivňují expresi genů jaterních myofibroblastů. Účinek obou látek byl časově závislý. Mezi ovlivněnými geny byly proteiny extracelulární matrix, matrixové metaloproteinázy i některé cytokiny. Zjistili jsme, že je růstový faktor FGF-1 i syntetická látka WY-14643 rozdílně ovlivňují expresi mRNA v buňkách kultivovaných na plastové Petriho misce a v buňkách kultivovaných v 3D prostředí kolagenního gelu.

Klíčová slova: jaterní myofibroblasty, expze genů, jaterní fibróza

SUMMARY

Liver fibrogenesis is the result of activation of two cell types – hepatic stellate cells (HSC) and liver myofibroblasts (MFB). We have studied the influence of cellular environment on gene expression in rat liver MFB. We have compared the common way of cell cultivation on polystyrene Petri dishes with cell culture in three-dimensional (3D) environment. The cells were treated with two different substances – fibroblast growth factor FGF-1 and the ligand of PPAR α receptors WY-14643.

MFB were isolated from a fraction rat liver nonparenchymal cells by repeated passaging. They were plated on polystyrene culture dishes or in collagen or fibrin gels. The studied substances were added into the cultivation medium. The cells were harvested at different time intervals. Total RNA was isolated from the cells and cDNA was synthesised. Gene expression was determined by rtRT-PCR. Data were statistically analysed by Student t-test ($p \leq 0,05$).

Our study showed that growth factor FGF-1 and PPAR α ligand WY-14643 affect gene expression in liver MFB. Among the genes affected there were extracellular matrix proteins, matrix metalloproteinases and some cytokines. We have found that both the growth factor FGF-1 and the synthetic substance WY-14643 differently affect mRNA expression in cells cultured on plastic substrate and in the 3-D structure of collagen gel.

Keywords: liver myofibroblasts, gene expression, liver fibrosis

SEZNAM ZKRATEK

Bcl-2	protein Bcl-2
CD95 L	ligand molekuly CD95
Col1a2	prokolagen typu I alfa 2
CTGF	tkáňový pojivový růstový faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
ET-1	endotelin 1
FBS	fetální telecí sérum
FGF-1	kyselý růstový faktor fibroblastů
FGF-2	bazický růstový faktor fibroblastů
FGFR	receptor růstového faktoru fibroblastů
GFAP	gliový kyselý fibrilární protein
GTC	guanidin izothiokyanát
HAS-2	hyaluronansyntáza 2
HBSS(+)	Hanksův solný roztok s vápníkem a hořčíkem
HBSS(-)	Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku
HGF	růstový faktor hepatocytů
HSC	jaterní hvězdčicové buňky
I-CAM	intrabuněčná adhezní molekula
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
LUM	lumikan
MCP-1	monocytový chemotaktický protein 1
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů
MFB	myofibroblasty
MMP	matrixová metaloproteináza
NASH	nealkoholická steatohepatitida
N-CAM	adhezní molekula nervových buněk

p53	protein
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor produkovaný destičkami
PPAR	receptory aktivované peroxizómovými proliferátory
RNA	ribonukleová kyselina
ROI	reaktivní kyslíkové radikály
RT	enzym reverzní transkriptáza
RXR	retinoidní receptor X
SPP	osteopontin
TGF- β 1	transformující růstový faktor β 1
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TS	fyziologický roztok s puftrem TRIS-HCl
TSP-2	thrombospondin 2
uPA-R	receptor pro aktivátor uroplazminogenu
V-CAM	vaskulární adhezní molekula
WY-14643	pirixinová kyselina
α -SMA	hladkosvalový α aktin

OBSAH

ÚVOD	12
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1. JATERNÍ FIBRÓZA	13
1.2. FIBROGENNÍ BUŇKY V JÁTRECH - JATERNÍ HVĚZDICOVITÉ BUŇKY A JATERNÍ MYOFIBROBLASTY	14
1.2.1. HSC.....	14
1.2.2. Myofibroblasty.....	17
1.3. TERAPIE JATERNÍ FIBRÓZY.....	19
1.3.1. Nové cesty v terapii jaterní fibrózy.....	19
1.3.2. PPAR receptory a jejich možné ovlivnění.....	20
1.3.3. WY-14643	22
1.4. SYNTÉZA A DEGRADACE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX.....	23
2. METODICKÁ ČÁST	26
2.1. PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	26
2.2. LABORATORNÍ POTKANI	29
2.3. PERFUZE JATER.....	29
2.3.1. Perfuzní roztoky.....	29
2.3.2. Anestezie zvířete, laparotomie a kanylace v. portae.....	29
2.4. IZOLACE JATERNÍCH HVĚZDICOVITÝCH BUNĚK	30
2.5. IZOLACE KOLAGENU Z OCASNÍCH ŠLACH POTKANŮ	31
2.6. PŘÍPRAVA GELŮ	32
2.6.1. Fibrinový gel.....	32
2.6.2. Kolagenní gel.....	32
2.7. SKLÍZENÍ BUNĚK Z GELŮ PRO IZOLACI RNA (neenzymaticky)	32
2.9. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	34
2.10. SYNTÉZA cDNA.....	35
2.11. REAL-TIME RT PCR (rtRT-PCR)	36
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
4. VÝSLEDKY	43

4.1.	MORFOLOGIE BUNĚK	43
4.2.	EXPRESE GENŮ NA PLASTU	44
4.3.	EXPRESE GENŮ V KOLAGENNÍM GELU	49
5.	DISKUSE	51
ZÁVĚR.....		54
LITERATURA.....		55

ÚVOD

Jaterní fibróza je dynamický proces vznikající po toxickém, infekčním nebo metabolickém poškození jaterního parenchymu a projevuje se nadměrnou akumulací vazivových bílkovin. Jde o dynamický proces, kdy normální extracelulární matrix je degradována matrixovými metaloproteinázami (MMP) a nahrazena vazivem, v němž převažuje kolagen typu I, který je syntetizován aktivovanými jaterními hvězdnicovými buňkami (HSC) a jaterními myofibroblasty (MFB).

Jaterní hvězdnicové buňky se nacházejí v Disseho prostoru a jejich hlavní funkcí ve zdravých játrech je skladování vitamínu A. Při poškození jater dochází k jejich aktivaci, změně fenotypu a produkci patologické extracelulární matrix (ECM) bohaté na kolagen typu I.

Práce zabývající se studiem buněk zapojených do tvorby ECM ukazují, že aktivované HSC nejsou jediným zdrojem patologické ECM v játrech, ale do procesu fibrotizace se zapojují také jaterní myofibroblasty. Ty mohou být různého původu. Portální myofibroblasty se nacházejí v pojivové tkáni kolem portálních cév a žlučovodů a byly popsány také tzv. „interface“ myofibroblasty lokalizované v jaterním parenchymu.

V této práci jsme se zaměřili na ovlivnění exprese genů myofibroblastů, které jsou pravděpodobně portálního původu, kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu, přičemž jsme navázali na výsledky Mgr. Aleny Jiroutové a spol. MFB jsme ovlivňovali jednak přirozeně se vyskytujícím cytokinem, kyselým růstovým faktorem fibroblastů (FGF-1), jednak syntetickou látkou WY-146433, ligandem receptorů PPAR α .

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. JATERNÍ FIBRÓZA

Jaterní fibróza je dynamický proces vedoucí k nadměrné akumulaci proteinů extracelulární matrix (ECM) v játrech, zejména kolagenu typu I a III, proteoglykanů a glykoproteinů. Vzniká jako odpověď na přetrvávající poškození jater u mnoha typů chronických jaterních onemocnění – chronické hepatitidy B a C, obstrukce žlučového, nealkoholické steatohepatitidy (NASH) a při nadměrném užívání alkoholu.

Proces jaterní fibrózy je charakterizován nekrotizací jaterních buněk, tvorbou vaziva a přestavbou jaterního parenchymu, kdy nekrotická funkční tkáň je nahrazována vazivem a zároveň výrazně stoupá i novotvorba vaziva. Fibrogenních procesů se účastní řada buněk a chemických látek (cytokinů, chemokinů, růstových faktorů). Rozvinutá jaterní fibróza přechází do jaterní cirhózy, která obvykle vede k selhání jater, portální hypertenzi a často vyžaduje transplantaci jater. Portální hypertenze se objevuje v důsledku zvýšeného odporu v jaterním řečišti. Ten může být buď mechanický (vzniká při přestavbě struktury jater a fibrózy) anebo funkčně podmíněný (endoteliální dysfunkce, aktivace HSC, zvýšená produkce endotelinu, snížená produkce NO).

Fibrotizační pochody v játrech jsou důsledkem aktivace určitých typů buněk – jaterních hvězdicových buněk (HSC) a jaterních myofibroblastů (MFB). K aktivaci buněk dochází působením profibrogenních cytokinů. Jejich zdrojem jsou odumírající hepatocyty i zánětlivý infiltrát. To vše vede k degradaci normální ECM a jejímu nahrazování ECM bohatou na kolagen typu I (viz. kapitola 1.4). Matrix hromadící se v Disseho prostoru je příčinou ztráty fenestrace jaterního endotelu, tzv. kapilarizace sinusoid. Jednotlivé typy fibróz se liší histologickým nálezem. U chronické hepatitidy B, hepatitidy C a chronické cholestázy se fibróza vyvíjí na okraji portálních traktů jako důsledek zánětlivého poškození jaterní tkáně a nekrotizace hepatocytů. U jaterního poškození navozeného alkoholem a NASH se fibróza vyvíjí v pericentrální a perisinusoidální oblasti jako následek poškození jaterní tkáně oxidativním stresem (Pinzani 2000).

1.2. FIBROGENNÍ BUŇKY V JÁTRECH - JATERNÍ HVĚZDICOVITÉ BUŇKY A JATERNÍ MYOFIBROBLASTY

1.2.1. HSC

Jaterní hvězdicové buňky (HSCs) jsou buňky, které hrají klíčovou roli v odpovědi jater na poškození. Tvoří přibližně třetinu neparenchymální buněčné populace, což je okolo 15% normální jaterní tkáně. Nachází se v Disseho prostoru, prostoru mezi buňkami jaterního parenchymu (hepatocyty) a endoteliálními buňkami sinusoid (Jezequel a spol. 1984, Li a Friedman 2001).

HSC mají větvenité tělo, svými nápadně dlouhými rozvětvenými cytoplasmatickými výběžky zasahují pod buňky endotelu a obtácejí se kolem sinusoid. Na luminální straně zasahují výběžky mezi hepatocyty. Tento blízký kontakt mezi HSC a ostatními typy buněk napomáhá mezibuněčnému transportu mediátorů a cytokinů. Kromě toho mají HSC přímé spojení s nervovými zakončeními, která mají význam při vasoregulaci (Bioulac-Sage 1990).

V normálních játrech je základní funkcí HSC skladování a transport retinoidů. Za normálních okolností je 50-80% vitamínu A uskladněno v játrech, z toho většina v HSC ve formě esterů retinolu uzavřených do cytoplasmatických kapének. Počet kapének kolísá v závislosti na množství vitamínu A v organismu (Senoo a spol. 1997). Během aktivace HSC dochází ke ztrátě kapének obsahujících vitamín A. Zatím není jasné, zda ztráta retinolu je potřebná k aktivaci HSC a které retinoidy mohou aktivaci urychlit nebo jí naopak předejít.

Během poškození jater různé etiologie se mění morfologie HSC, buňky se aktivují. Mění se také exprese genů. Tyto změny zahrnují proliferaci HSC, zvýšení kontraktility, fibrogenezi, chemotaxi HSC, degradaci ECM, ztrátu retinolu, produkci cytokinů a chemoatraktaci leukocytů. Výsledkem jsou změněné buňky fibroblastického typu (Friedman 2000). Přechody mezi oběma fenotypy se dějí zpočátku pomocí parakrinních a posléze autokrinních drah a díky interakcím mezi HSC a ECM.

K aktivaci HSC nedochází okamžitě po poškození jater, ale s přetrvávajícím poškozením roste počet aktivovaných buněk. In vitro při kultivaci na plastiku

(Jiroutová a spol. 2005) a také u HSC kultivovaných na kolagenním gelu typu I (Sato a spol. 2003) dochází k aktivaci HSC za 5 – 7 dní. Počet HSC v poškozených játrech stoupá v důsledku působení růstových faktorů působících přes tyrosinkinázové receptory (Ankoma-Sey a spol. 1998). Nejvýznamnějším mitogenem produkovaným HSC během poškození jater je růstový faktor destiček (PDGF). Dochází k autokrinní tvorbě PDGF a také vyšší expresi PDGF receptorů na membráně buněk (Friedman 2000). Dalšími mitogeny způsobujícími proliferaci HSC jsou TGF β 1, thrombin, endotelin-1 (ET-1) aj. (Li a Friedman 2001).

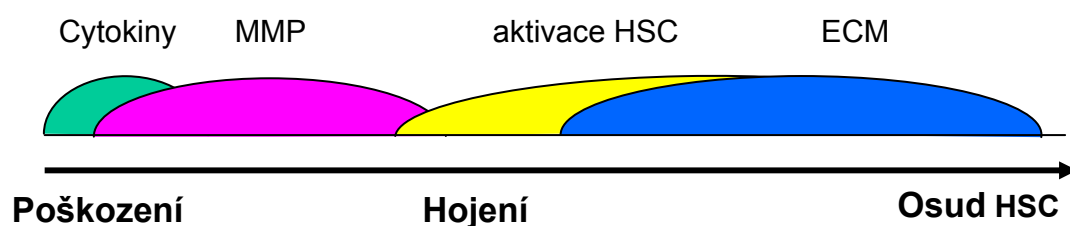
Aktivované HSC jsou schopny kontrakce (Rockey a spol. 1993). HSC jsou díky své lokalizaci považovány za tkáňově specifické pericyty, které regulují průtok krve sinusoidami. Jsou citlivé na vasokonstrikční látky jako je thrombin, angiotensin II, tromboxan a prostaglandin. V aktivovaných HSC byla prokázána produkce endotelinu-1 (ET-1), látky běžně produkované buňkami endotelu (Li a Friedman 2001). ET-1 zvyšuje expresi hladkosvalového alfa aktinu (α -SMA), základního cytoskeletárního markeru buněk hladkých svalů a myofibroblastů. Aktivované HSC brání toku krve kontrakcí sinusoid cirhotických jater a tím podporují rozvoj portální hypertenze.

HSC se po aktivaci stávají zdrojem cytokinů v játrech. HSC produkují transformující růstový faktor α (TGF- α) a epidermální růstový faktor (EGF) důležitý pro proliferaci jaterní tkáně během regenerace jater (Li a Friedman 2001). Tyto cytokiny také stimulují proliferaci buněk. HSC dále produkují růstový faktor hepatocytů (HGF), jehož produkce klesá při akutním poškození jater (Mahler 1993), prozánětlivý interleukin-6 (IL-6) (Reeves a Friedman 2002, Li a Friedman 2001), který stimuluje HSC k expresi kolagenu typu I a tím přispívá k akutní odpovědi a protizánětlivý interleukin-10 (IL-10), jehož exprese je zvýšena v časně fázi aktivace HSC (Friedman 2008). IL-10 má značnou antifibrogenní aktivitu, snižuje expresi kolagenu I a zvyšuje expresi intersticiální kolagenázy (MMP-13) (Thompson a spol. 1998).

V odpovědi na poškození jater HSC produkují latentní formu transformujícího růstového faktoru β 1 (TGF- β 1), který je aktivován proteolyticky (především plazminem) (Friedman 2000). K nárůstu exprese TGF- β 1 dochází jak při fibróze jater u lidí tak i při experimentálně navozené fibróze (Friedman 2008). TGF- β 1 je

hlavním stimulem HSC k produkci ECM. Přes mnoho zdrojů tohoto cytokinu je nejdůležitější jeho autokrinní exprese.

HSC podporují chemotaxi monocytů a tím i zánětlivou reakci produkcí faktoru stimulujícího kolonie makrofágů (M-CSF) a monocytového chemotaktického proteinu-1 (MCP-1), které regulují migraci, akumulaci a růst makrofágů (Czaja a spol. 1994). Dále exprimují různé adhezní molekuly důležité pro migraci buněk. Jsou to např. intrabuněčné adhezní molekuly 1 (I-CAM-1), adhezní molekuly 1 vaskulárních buněk (V-CAM-1) a adhezní molekuly nervových buněk (N-CAM) (Czaja a spol. 1994). Expese I-CAM-1 roste po aktivaci HSC a uplatňuje se při adhezi lymfocytů k aktivovaným HSC (Li a Friedman 2001). Aktivované HSC jsou schopny migrovat do míst poškození, produkovat metaloproteinázy, schopné degradace normální subendoteliální ECM a syntetizovat patologickou ECM. Tato změna složení ECM ovlivňuje chování hepatocytů, buněk endotelu sinusoid a HSC. Klíčovým chemoatraktantem je PDGF a monocytový chemotaktický protein 1 (MCP-1) (Olaso a spol. 1998).



Obr. 1.1: Schematické zobrazení dějů, ke kterým dochází během fibrogeneze (zdroj: Han 2006)

Parakrinní podněty poškozených sousedních buněk, hepatocytů, endotelových a Kupferových buněk a trombocytů, podporují změny ve složení ECM. Hepatocyty a Kupferovy buňky jsou silnými zdroji reaktivních kyslíkových radikálů (ROI) (Mahler 1999), které stimulují fibrogenní potenciál HSC. Jejich aktivita je zesílena při nedostatku nebo úplném chybění antioxidantů, k čemuž dochází při poškození jater. Také buňky endotelu hrají důležitou roli v aktivaci HSC. Poškození buněk endotelu sinusoid stimuluje produkci fibronektinu (izoformy EIIIA), který má schopnost aktivace HSC (Jarnagin a spol. 1994).

Otázka zániku HSC není zatím zcela jasná. Během hojení akutního a experimentálního poškození jater počet aktivovaných HSC klesá, jakmile je obnovena integrita tkáně. Jsou dvě možné cesty zániku aktivovaných HSC. Buď je to návrat do klidového stavu nebo apoptóza. Návrat do klidového stavu ovlivňuje IL-10, který potlačuje zánět a zvyšuje aktivitu intersticiální kolagenázy. Jeho produkce je během aktivace HSC podporována, jelikož snižuje expresi kolagenu typu I a poskytuje negativní zpětnou vazbu k omezení hromadění vaziva (Friedman 2000). Druhou možnou cestou zániku aktivovaných HSC je apoptóza, která byla studována v souvislosti se zvýšenou expresí CD95 L (Fas ligand), Bcl-2 a p53 (Friedman 2000) [10]. Apoptóza je u HSC spojena s poklesem exprese tkáňového inhibitoru MMP-1 (TIMP-1) (Murphy a spol. 2002).

1.2.2. Myofibroblasty

Jak už bylo uvedeno výše, v patogenezi jaterní tkáně hrají důležitou roli jaterní hvězdicové buňky, první popsaný typ neparenchymových jaterních buněk, ze kterých po aktivaci vznikají tzv. septální myofibroblasty, které se nacházejí na rozhraní mezi parenchymem a fibrotickým septem. Tyto myofibroblasty se dají charakterizovat pomocí základních cytoskeletálních proteinů – hladkosvalového alfa aktinu (α -SMA), desminu, kyselého gliálního fibrilárního proteinu (GFAP) a adhezní molekuly N-CAM. V posledních letech se vědecká veřejnost zajímá také o další typy myofibroblastů přítomných v játrech, a to o portální myofibroblasty nacházející se v pojivové tkáni kolem portálních cév a žlučvodů. Byly také popsány tzv. „interface“ myofibroblasty lokalizované v jaterním parenchymu. Jednoznačný znak pro odlišení těchto tří typů myofibroblastů zatím není k dispozici (Cassiman a spol. 2002). Aktivované HSC i portální MFB exprimují α -SMA a jsou GFAP negativní. Liší se expresí fibulinu-2 a desminu. Aktivované HSC jsou fibulin-2 negativní a desmin pozitivní, zatímco portální MFB jsou fibulin-2 pozitivní a desmin negativní (Ramadori a Saile 2002, Jiroutová a spol 2007).

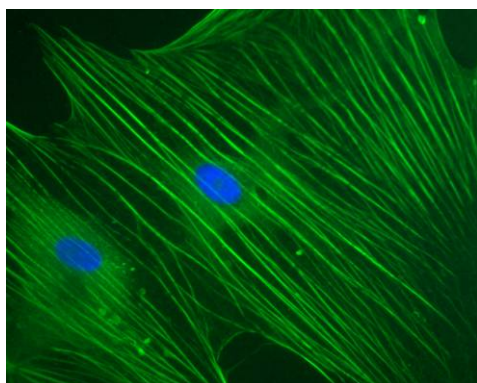
HSC v normálních játrech exprimují GFAP, asi polovina exprimuje desmin (pouze u potkanů), ale jsou α -SMA negativní. Po poškození jater nebo in vitro po dvou dnech kultivace na plastru se aktivují, začínají proliferovat, mění tvar,

exprimují α -SMA a ztrácí pozitivitu na GFAP. Pokud je kultura buněk 4-5 krát pasážována, HSC hynou apoptózou a jsou nahrazeny proliferujícími portálními MFB, které kontaminují primární kulturu HSC (Ramadori a Saile 2004). Po 2-3 pasážích se vlastnosti kultury výrazně mění. Buňky ztrácí pozitivitu na desmin, ale většina buněk exprimuje fibulin-2. Portální MFB exprimují prokolagen typu I a domníváme se, že jsou časnými mediátory při vzniku biliární fibrózy jater, na rozdíl od HSC, které odpovídají za pozdější buněčnou odpověď (Wells a spol. 2004).

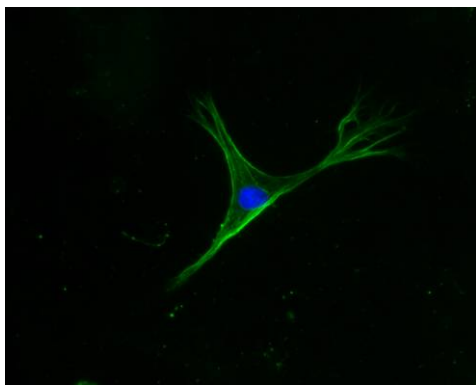
MFB můžou být také získány jako vedlejší frakce neparenchymových buněk pomocí elutriační centrifugace nebo mohou být vykultivovány z částí intrahepatálních žlučovodů po podvazu ductus choledochus. HSC a MFB se liší svým původem a umístěním v játrech.

Studie Knittela a spol. (1999a) ukázala, že populace aktivovaných HSC a portálních MFB se liší expresí určitých proteinů a studie Jiroutové a spol. (2007) toto potvrdila. Aktivované HSC tedy nejsou jediným druhem buněk, který se podílí na produkci ECM v poškozených játrech.

MFB kultivované na plastu i v kolagenním gelu exprimují hladkosvalový alfa-aktin. Ve velikosti buněk je podstatný rozdíl, viz. Obr. 1.2 a 1.3 (námi izolované buňky).



Obr. 1.2: Exprese α -SMA, MFB kultivované na plastu, zvětšeno 600x



Obr. 1.3: Exprese α -SMA, MFB kultivované v kolagenním gelu, zvětšeno 600x (zdroj Jiroutová A., nepublikované výsledky)

1.3. TERAPIE JATERNÍ FIBRÓZY

V léčbě jaterní fibrózy bez ohledu na etiologii jsou doporučena obecná opatření, jakými jsou abstinence alkoholu, dieta s důrazem na dodržení doporučené dávky vitaminů a stopových prvků. Komplikacemi mohou být ascites, který se léčí podáním diuretik a snížením příjmu sodíku, encefalopatie a krvácení z varixů, kde jako prevence slouží podání betablokátorů. Tyto komplikace vedou často k indikaci transplantace jater (Příbramská a Husová 2007).

1.3.1. Nové cesty v terapii jaterní fibrózy

V posledních letech se v experimentálních studiích objevují výsledky, které ukazují na možnost částečné reversibility jaterní fibrózy (Benyon a Iredale 2000). Tato zjištění podnítila vývoj nových typů antifibrotických léčiv. Antifibrogenní léčba směřuje k potlačení základního onemocnění - v případě virových hepatitid se využívají interferony α a γ , nebo k potlačení zánětlivé reakce a imunitní odpovědi, kdy se využívají kortikosteroidy. Dalším z cílů antifibrogení terapie může být inhibice aktivace a proliferace zmíněných fibrogenních buněk (antioxidanty, vitaminy a některé cytokiny) nebo degradace ECM proteinů (antagonisté TGF β) (Příbramská a Husová 2007). Aktivace HSC je mimo jiné vyvolána kyslíkovými

radikály. Pozitivních výsledků bylo dosaženo využitím antioxidantů (např. vitamin E, N-acetylcystein) (Houglum a spol. 1997, Chojkier a spol. 1998, Kim a spol. 2001). Také inhibice PDGF receptoru využívající tyrosinkinázové inhibitory (např. genistein, imatinib) blokuje aktivaci HSC *in vitro* i *in vivo*. Tyto přístupy se však testují jen experimentálně. Spontánní návrat fibrózy k normálnímu stavu jaterní tkáně (často po odstranění vyvolávajícího faktoru) je spojený s apoptózou HSC, takže se uvažuje o indukci apoptózy jako prostředku léčby jaterní fibrózy (Lotersztajn a spol. 2005, Iimuro a Brenner 2008).

Jednou z dalších možností je terapeutické využití agonistů receptorů aktivovaných peroxizómovými proliferátory (PPAR) a to hlavně PPAR- γ . PPAR- γ vážou antidiabetické thiazolidindiony stejně jako eikosanoidy, které mají protizánětlivé, růst inhibující a proapoptotické vlastnosti a tím potlačují rozvoj fibrózy. Tyto jejich vlastnosti byly potvrzeny u experimentálního modelu a jsou příslibem pro léčbu fibrózy (Lotersztajn a spol. 2005).

V budoucnosti by mohlo být také využíváno cíleného dopravování léčiv k místu poškození. K tomu je možné využít sloučeniny kovalentně vázané na cyklické peptidy, které se specificky vážou na receptory exprimované fibrogenními buňkami.

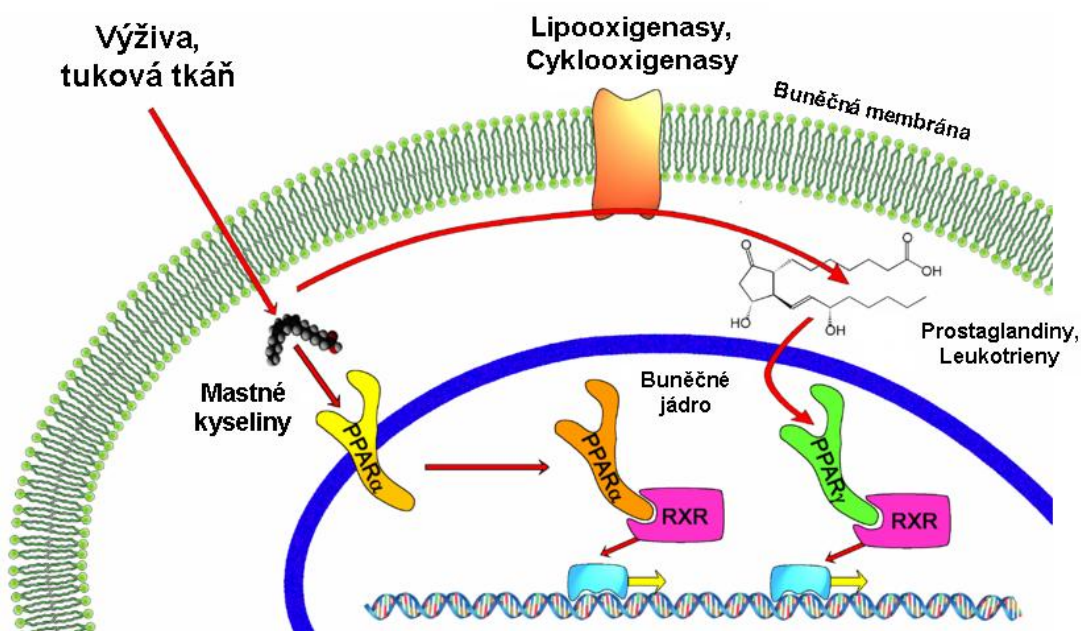
Uvažuje se také o možnostech genové terapie. Jde o dopravu genu pro MMP (zejména MMP-1) do míst poškození s využitím virových a nevirálních vektorů. Použití virových vektorů (zejména adenoviry a adeno-asociované viry) s sebou nese velká rizika, jako jsou imunogenicita a toxicita vektoru, endogenní rekombinace viru a onkogenní efekty viru.

1.3.2. PPAR receptory a jejich možné ovlivnění

Receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (PPAR) jsou skupinou jaderných receptorů, které fungují jako transkripční faktory regulující expresi genů. Hrají důležitou roli v regulaci β -oxidace mastných kyselin, akumulaci triglyceridů v játrech a ovlivňují citlivost buněk k insulinu. Existují tři typy PPAR – α , γ a β/δ . V naší práci jsme se zaměřili na typy α a γ . PPAR- α se nachází především v jaterní a svalové tkáni, kde se podílejí na regulaci β -oxidace mastných kyselin. PPAR- γ se vyskytují zejména v tukové tkáni, kde regulují její diferenciaci a akumulaci

triglyceridů a dále ve svalové a jaterní tkáni kde ovlivňují (zvyšují) citlivost buněk k insulinu (Michalik a spol. 2006, Kallwitz a spol. 2008).

K aktivaci PPAR dochází po navázání specifických ligandů, tzv. PPAR agonistů, které se liší u jednotlivých typů PPAR. Agonisty PPAR- α jsou mastné kyseliny exogenními agonisty jsou pak fibráty. Agonisty PPAR- γ jsou prostaglandiny a leukotrieny, exogenními ligandy jsou thiazolidindiony. Po navázání agonisty aktivovaný PPAR vytvoří heterodimer s nukleárním retinoidním receptorem X (RXR) a ten se naváže na specifické regulační elementy, tzv. peroxisome proliferator responsive elements (responzivní elementy pro peroxisomové proliferátory) lokalizované v nekódujících oblastech genů. Tato vazba aktivuje transkripci specifických genů a následnou syntézu příslušných proteinů, čímž dochází k vlastnímu biologickému účinku PPAR (Anderlová a spol. 2006) viz obr. 1.4.

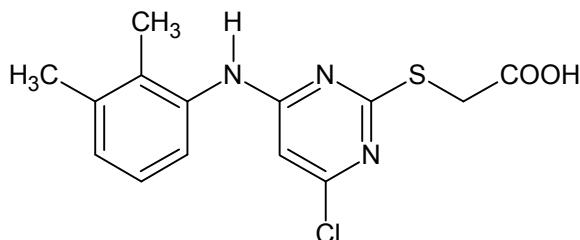


Obr. 1.4: Cesty působení PPAR- α a PPAR- γ (zdroj: en.wikipedia.org)

PPAR- γ agonisté mají protizánětlivé účinky, antifibrotický potenciál (Burgess a spol. 2005) a mají schopnost řídit genovou transkripci a diferenciaci buněk. Existuje tedy možnost, že PPAR- γ agonisté mohou zasahovat do biologických dějů, které ovlivňují fenotyp aktivovaných HSC. Bylo zjištěno, že působení ligandů PPAR- γ na kultury lidských HSC inhibuje proliferaci buněk, jejich migraci a expresi chemokinů (Marra a spol. 2000).

1.3.3. WY-14643

Tato látka, také známá pod názvem pirixinová kyselina má sumární vzorec $C_{14}H_{14}ClN_3O_2S$.



Obr. 1.5: Strukturní vzorec látky WY-14643

Aktivuje PPAR- α ale také PPAR- γ receptory. WY-14643 po navázání na PPAR- α zvyšuje expresi genů, které kódují peroxisomální a mitochondriální enzymy β -oxidace a transportní proteiny mastných kyselin. Tím brání akumulaci lipidů v játrech a nabízí možnost využití jako prevence steatohepatitidy.

Další možnou cestou ochrany jater díky látce WY-14643 je zvýšená exprese genů, které zvyšují expresi enzymů CYP4A (cytochrom P450 4A). Tyto enzymy štěpí prozánětlivé cytokiny (prostaglandiny, leukotrieny) a koncové produkty peroxidace lipidů, a tím snižují zánětlivou odpověď imunitního systému v játrech (Ip a spol. 2003).

V řadě prací se diskutuje vliv WY-14643 na expresi genů důležitých při rozvoji jaterní fibrózy. Pokusy provedené na myších krmených potravou s nízkým obsahem methioninu a cholinu (MCD) ukázaly, že WY-14643 přidaný do potravy potlačuje fibrózu i expresi kolagenu typu I (Ip a spol. 2004). WY-14643 způsobuje proliferaci peroxizomů a hepatomegalii (zvětšení jater) u hlodavců (Issemann a Green 1990). Toyama a spol. 2004 zjistili, že WY-14643 výrazně snižuje thioacetamidem indukovanou fibrózou u potkanů, pravděpodobně aktivací antioxidantních enzymů katalázy a superoxiddismutázy, které potlačují oxidační stres hepatocytů. Snižena byla exprese kolagenu typu I i růstového faktoru TGF β -1. Tato zjištění byla stimulem pro naši práci, ve které jsme se zaměřili na působení látky WY-14643 na expresi genů jaterních myofibroblastů. Vedle kolagenu typu I jsme mezi sledované geny zahrnuli i další proteiny matrix – osteopontin, thrombospondin 2,

proteoglykan lumikan, enzym hyaluronansyntázu 2, metaloproteinázy 2, 3, 7, 9 a 13, inhibitor metaloproteináz TIMP-1, inhibitor aktivátoru PAI-1 a profibrotické cytokiny TGF- β 1 a CTGF.

1.4. SYNTÉZA A DEGRADACE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Jaterní extracelulární matrix (ECM) je komplikovanou strukturou makromolekul, která podléhá remodelaci během růstu a poškození jater. Jaterní ECM tvoří nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně a také poskytuje mnoho signálů přítomným buňkám (hepatocytům, zánětlivým buňkám, apod.) nutných k udržení polarity buňky, migraci, proliferaci a diferenciaci. Signály vznikající při interakci molekul ECM se specifickými buněčnými receptory (integriny) jsou převáděny do buňky a prostřednictvím cytoskeletu ovlivňují transkripci genů. ECM slouží jako zásobárna růstových faktorů, které se uvolňují v případě poškození tkáně, čímž dochází k zesílení fibrotizačních pochodů. Normální i patologická ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty. Kolagenní složka sestává z kolagenů různých typů, nekolagenní složka z glykoproteinů a proteoglykanů (Taimr 2002). Strukturální jednotka kolagenu má tvar pravovotočivé trojšroubovice a skládá se ze tří řetězců α .

Ve zdravých játrech se v Disseho prostoru nachází nízkohustotní subendotelová matrix sestávající z kolagenů typu IV, VI a XIV, glykoproteinů a proteolykanů. Naopak intersticiální matrix, jejíž hlavní součástí je fibrilární kolagen (např. typ I a III), buněčný fibronectin, undulin (kolagen XIV) aj., se nachází v pouzdře, kolem velkých cév a v portální oblasti. V poškozených játrech je nízkohustotní subendotelová matrix, která svým složením připomíná bazální membránu, nahrazována intersticiální matrix bohatou na kolagen I (Li a Friedman 1999).

HSC jsou hlavním zdrojem ECM ve zdravých i poškozených játrech. Produkují širokou škálu látek: kolagen typu I, III, IV, V, VI a XIV, proteoglykany, glykoproteiny (buněčný fibronectin, laminin, kyselinu hyaluronovou). Během chronického poškození jater dochází ke změně fenotypu HSC a zvýšení syntézy

ECM bohaté na kolagen typu I. Akumulace tohoto typu ECM je důsledkem nerovnováhy mezi syntézou a degradací ECM, jenž se posunuje ve prospěch fibrogeneze. HSC se velkou měrou podílejí na degradaci ECM a to syntézou enzymů, zejména matrixových metaloproteináz (MMP) a jejich inhibitorů – tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) (Li a Friedman 2001).

Matrixové metaloproteinázy se dělí do 5 skupin podle své substrátové specifity:

- intersticiální kolagenázy (MMP-1,-8,-13)
- želatinázy (MMP-2,-9)
- stromelysiny (MMP-3,-7,-10,-11)
- membránového typu (MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25)
- metaloelastázy (MMP-12)

Změny v aktivitě proteáz během poškození jater vedou k přestavbě ECM. Aktivované HSC exprimují všechny klíčové komponenty které vedou k degradaci ECM, zejména želatinázy MMP-2 a 9, stromelysin 1 (MMP-3) a kolagenázu MMP-13 (ekvivalent MMP-1 u potkanů). Aktivace latentní formy MMP-2 vyžaduje interakci s hepatocyty (Theret a spol. 1997). Výrazně zvýšená exprese MMP-2 je charakteristická pro cirhózu. ECM bohatá na kolagen I, která převažuje v poškozených játrech, zesiluje aktivaci HSC a to vede k produkci MMP-2 pozitivní zpětnou vazbou (Friedman 2000).

Aktivita MMP je řízena na úrovni genové exprese, proteolytickou aktivací prekurzorů MMP a vazbou na tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP). HSC produkují funkční TIMP-1 a TIMP-2, které během poškození jater inhibují aktivitu intersticiální kolagenázy a to vede k poklesu degradace hromadící se intersticiální matrix. Exprese TIMP-1 inhibuje apoptózu HSC a tím znásobuje počet aktivovaných buněk (Murphy a spol. 2004). HSC také exprimují receptor pro aktivátor uroplasminogenu (uPA-R) a jeho inhibitor (PAI-1), které se uplatňují při aktivaci MMP (Friedman 2008).

Kyselý a bazický růstový faktor fibroblastů (FGF-1 a FGF-2) patří do rodiny 23 dosud známých růstových faktorů fibroblastů a mají afinitu k čtyřem různým receptorům FGF. FGF-1 a FGF-2 nejsou secernovány buňkami, ale mohou se

vyskytovat na buněčné membráně a v ECM. FGF-1 a FGF-2 mohou být uvolňovány z poškozených buněk nebo exocytózou závislou na cestě ER-Golgiho aparát.

V podmínkách *in vitro* působí FGF-1 na buňky různého původu. Je přítomný v perisinusoidálních HSC v regenerujících se játrech. FGF-1 a FGF-2 jsou polypeptidy a ve zdravých játrech se nachází v ECM nebo ve vazbě na buněčnou membránu (Ornitz a Itoh 2001). Tyto polypeptidy jsou zde v inaktivované formě a jejich aktivace a syntéza je zahájena po ztrátě nebo poškození jaterní tkáně. Yu a spol. 2003 prokázali, že nepřítomnost FGF-1 a FGF-2 má za následek intenzivní nekrózy hepatocytů, ale neovlivňuje proces obnovy jaterní tkáně po akutním působení CCl₄. U myši postrádajících geny pro FGF-1 i FGF-2 klesá počet HSC, je potlačena migrace HSC do míst poškozených CCl₄ a je potlačena indukce kolagenu typu I. Dochází také k výraznému poklesu fibrogenyze vyvolané chronickým podáváním CCl₄. Oba faktory působí nezávisle na sobě při indukcí kolagenu typu I jako odpovědi na poškození jater. Zdá se, že FGF-1 a FGF-2 mají důležitou úlohu při přestavbě ECM a nepůsobí jen jako faktory stimulující dělení fibroblastů. Chronická aktivace FGF-1 a FGF-2 může být na jedné straně základem nemocí abnormální a nadměrné ECM jako je fibrogenyze, na straně druhé, nepřítomnost FGF-1 a FGF-2 může vyústit v poruchy produkce ECM spojené s rozličnými patologickými stavy, jako je hojení ran, přestavba tkáně a deficiencie spojené se stárnutím. To naznačuje možnost využití FGF-1 a FGF-2 a jejich předpokládaných receptorů (FGFR1 a FGFR2) v HSC jako možný cíl prevence jaterní fibrózy a jiných nemocí spojených s nadměrnou produkcí nebo deficitem ECM. FGF-1 se sice uplatňuje při poškození a regeneraci jater (Marsden a spol. 1992), ale jeho působení na jaterní buňky je málo prostudováno.

2. METODICKÁ ČÁST

2.1. PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

Přístroje

centrifuga (Hettich 32 R)
inkubátor (Fisher Scientific)
inverzní mikroskop (Nikon)
mikrovlnná trouba (Daewoo)
peristaltická pumpa (Verder)
pH metr (WTW)
digitální teploměr
CO₂ inkubátor pro buněčné kultury (Snijders Scientific)
třepačka (Biometra)
homogenizátor ULTRA-TURRAX T 10 basic (IKA)
centrifuga (Hettich Universal 16)
spektrofotometr BioMate 3 (Thermo SpeCtronic)
zařízení pro elektroforézu EASY-CAST model B1A (OWL Scientific)
zdroj pro elektroforézu (Biometra)
UV transiluminátor (UVP)
termocykler pro real-time PCR 7500Fast (Applied Biosystems)
termocykler pro PCR T-personal (Biometra)
vortex (Scientific Industries)

Nástroje a materiál

pinzeta, zahnuté pinzety, ostré oční nůžky, peán, flexila, injekční stříkačka s
jehlou 25 G, silnější chirurgický silon
Braunly MT vel. 2 (Braun)
polyamidové síto UHELON 130T, póry 67 µm (Silk and Progress)

Chemikálie použité při perfuzi jater a při izolaci a kultivaci buněk

DNáza I (Roche)

Fetální telecí sérum - FBS (PAA)
Glutamin (Gibco)
Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku HBSS(-) (Gibco)
Hanksův solný roztok s vápníkem a hořčíkem HBSS(+) (Gibco)
Heparin (Zentiva)
Kolagenáza B (Roche)
Kultivační médium DMEM (Sigma)
Lidský rekombinantní FGF-1 (Sigma) - zásobní roztok: 10 µg FGF-1/ml
H₂O s 0,1% albuminu, sterilizován filtrací
Nembutal
Optiprep (Nycomed)
Penicilin G, K salt (Serva)
Pronáza (Roche)
Streptomycin sulfát (Serva)
Wy 14643 v DMSO (Cayman)

Chemikálie použité přípravě gelů

Hovězí fibrinogen (Calbiochem)
Hovězí hrombin (Sigma)
Kolagen z potkaních šlach

Chemikálie použité při sklizení buněk

PBS pufr (NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄·2H₂O, doplněno RNAse-free vodou)
TS pufr (Tris, NaCl, MgCl₂)
GTC(-) pufr (guanidium izothiokyanát, citrát sodný)
GTC(+) pufr (guanidium izothiokyanát, citrát sodný, merkaptoethanol)
Merkaptoethanol (Serva)

Chemikálie použité při izolaci RNA a měření koncentrace vyizolované RNA

RNeasy mini kit (Qiagen)
TRIS-HCl pH 7,5 (tris(hydroxymethyl)aminomethan + HCl)

Chemikálie použité při elektroforéze

Agaróza Seakem LE (FMC Bio Products)

10x borátový pufr (0,5 M kyselina boritá, 50 mM tetraboritan sodný, 100 mM síran sodný, 10 mM EDTA)

Formaldehyd (FLUKA)

Ethidium bromid (Sigma)

Denaturační pufr (formamid, 37% formaldehyd, 10x borátový pufr, glycerol, 2% vodný roztok bromfenolové modři, H₂O)

Chemikálie použité při syntéze cDNA a real-time PCR

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

sondy: TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

Tabulka 2.1: Sondy použité při syntéze cDNA a real-time PCR

Gen	GenBank přístupové číslo	Katalogové číslo
Ctgf	NM_022266.2	Rn00573960_g1
Has-2	NM_013153.1	Rn00565774_m1
Lum	NM_031050.1	Rn00579127_m1
Mmp-2 (želatináza A)	NM_031054.2	Rn02532334_s1
Mmp-3 (stomelyzin-1)	NM_133523.1	Rn00591740_m1
Mmp-7 (matrilysin)	NM_012864.2	Rn00563467_m1
Mmp-9 (želatináza B)	NM_031055.1	Rn00579162_m1
Mmp-13 (kolagenáza3)	NM_133530.1	Rn01448194_m1
Spp-1	NM_012881.2	Rn00563571_m1
Pai-1	NM_012620.1	Rn00561717_m1
Col1a2	NM_053356.1	Rn00584426_m1
Tgf-β1	NM_021578.2	Rn00572010_m1
Tsp-2	XM_214778.4	Rn01513690_m1
Timp-1	NM_053819.1	Rn00587558_m1
18S RNA	NR_003286.2	Hs03003631_g1

Použitý software

7500 Fast System SDS Software version 1.3.1

Microsoft Excel 2003

2.2. LABORATORNÍ POTKANI

Projekt pokusů byl schválen odbornou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové dne 8.1.2001. Veškeré práce se zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK.

Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab – Praha), o hmotnosti 350 - 450g. Potkani byli chováni v klimatizovaných místnostech při teplotě 22°C a potrava jim byla poskytnuta *ad libitum*.

2.3. PERFUZE JATER

2.3.1. Perfuzní roztoky

Perfuze jater byla prováděna *in situ* postupně sterilními roztoky HBSS(-) (100 ml) a 0,2% pronázy (100 ml) a 0,01% kolagenázy (200 - 250 ml) v HBSS(+). Teplota roztoků byla 37°C, pH bylo 7,35 a rychlost perfuze 10 ml/min. Perfuze kolagenázou byla přerušena v okamžiku, když konzistence jater ukazovala, že struktura jaterních laloků byla rozrušena.

Po celý čas perfuze byla játra zahřívána lampou na 37°C. Teplota byla udržována 100 W žárovkou a kontrolována kovovým digitálním teploměrem vsunutým pod játra.

2.3.2. Anestezie zvířete, laparotomie a kanylace v. portae

Potkanovi byl podán Nembutal i. p. v dávce 50 mg/kg. Poté bylo zvíře fixováno k podložce v poloze na zádech, jeho břicho bylo oholeno a operační pole dezinfikováno 70% ethanolem.

Břišní dutina byla otevřena rozstřížením do tvaru V. Nůžkami byla nastřížena kůže i břišní svaly ve střední čáře nad symfýzou, nástřih byl nadzvednut chirurgickou pinzetou a nůžkami byla stříhána kůže i svaly dutiny břišní nahoru a laterálně na obě strany. Střih byl ukončen u žeber potkana, aby nebyl způsoben pneumotorax. Kůže a svalovina břišní stěny byla uchopena do peánu a překlopena na hrudník potkana.

Pomocí pinzet a malých nůžek byly uvolněny játra od všech ligament, odklopením jaterních laloků kraniálně byla odkryta portální žíla a zbavena okolního tuku a vaziva. Pod očištěnou v. portae byly připraveny tři ligatury, jedna co nejbližší ke střevu, druhá a třetí asi 1 cm od jaterního hilu.

Poté byl potkanovi podán do v. saphena roztok heparinu (2500 U). Místo vpichu bylo po aplikaci krátkodobě stlačeno.

Podvaz blíže střev byl zatažen úplně, heparinizovaná flexila byla zavedena do v. portae a fixována dvěma podvazy. Poté byla nasazena proplachovací hadička a zahájena perfuze. Neprodleně byla přestřižena v. cava inferior.

Játra byla promyta asi 100 ml HBSS(-), pak byla perfundována roztokem pronázy a poté roztokem kolagenázy. Po ukončení perfuze bylo pinzetou nadzdvíženo sternum, nůžkami odstřiženo vazivo a játra vyjmuta.

2.4. IZOLACE JATERNÍCH HVĚZDICOVITÝCH BUNĚK

V laminárním boxu bylo rozstřiženo jaterní pouzdro, buněčná suspenze přenesena do lahve 0,001% roztokem DNázy a inkubována 30 min ve vodní lázni za třepání při 37°C. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes polyamidovou tkaninu o velikosti pórů 67 µm do 50 ml centrifugačních zkumavek, doplněna HBSS(+) a centrifugována 7 minut při 400 g a při 4°C. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v HBSS(+) a centrifugace byla za stejných podmínek opakována. Potom byly buňky resuspendovány v HBSS(+) a přidán komerční 60% Optiprep do konečné koncentrace 17%. Buněčná suspenze byla opatrně promíchána a přelita do 15 ml zkumavek, převrstvena 11,5% Optiprepm, 2 ml HBSS(+) a centrifugována 17 min. při 1400 g a při teplotě 20°C. Bělorůžová vrstva buněk na rozhraní vodní fáze a Optiprepu byla odpipetována, zředěna HBSS(+) a centrifugována při 450 g, aby byly odstraněny zbytky Optiprepu. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v kultivačním médiu obohaceném o fetální telecí sérum (FBS) v konečné koncentraci 10% a o glutamin (konečná koncentrace 4 mM). Do média byla přidána antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml).

Počet získaných buněk byl stanoven počítáním v Bürkerově komůrce. Neživé buňky byly obarveny 0,2% trypanovou modří.

Buňky byly vysazeny na Petriho misky s plochou 60 cm² a kultivovány v termostatu v atmosféře 5% CO₂ a při vlhkosti 85%. Buňky byly pasážovány jednou týdně. Médium bylo měněno po dvou až třech dnech. Po čtvrté pasáži byly buňky vysazeny na fibrinový nebo kolagenní gel v Petriho miskách o ploše 8 cm² v počtu 250, respektive 200 tis. Druhý den byly buňky převrstveny vrstvičkou stejného gelu. Jako kontrolní buňky byly použity buňky kultivované na plastiku 60 cm² v počtu 800tis. 24 hodin před přidáním sledovaných látek (FGF-1 a WY-14643) bylo médium vyměněno za bezsérové a v miskách s gely byla koncentrace FBS snižována opakovanou výměnou média. Poté byly FGF-1 a WY-14643 přidány do média a buňky byly dále kultivovány v termostatu v atmosféře 5% CO₂ a při vlhkosti 85% po dobu 6, 12 a 24 hodin.

2.5. IZOLACE KOLAGENU Z OCASNÍCH ŠLACH POTKANŮ

K izolaci kolagenu byl použit ocas mladého potkana (o hmotnosti 180 - 200 g). Ocasní šlachy byly vypreparovány do fyziologického roztoku tak, aby během preparace nevyschly, nastříhány na drobné kousky a zváženy. Jejich suspenze ve sterilním fyziologickém roztoku byla nechána za pomalého míchání přes noc při 4°C. Poté byla přefiltrována a resuspendována v 0,25 M kyselině octové. Kolagen byl z roztoku extrahován za stálého míchání po dobu 48h při 4°C. Extrakt byl dialyzován při 4°C proti několika výměnách 0,02 M kyseliny octové a následně centrifugován při 9000 ot/min 40 min ve zkumavkách Corex. Koncentrace kolagenu byla stanovena vážkově po vysušení vzorku při 80°C. Poté byl kolagen naředěn na koncentraci 1,33 mg/ml 0,02M kyselinou octovou a sterilizován filtrací přes 0,45 µm filtr. Kolagen byl uskladněn při 4°C nebo zamražen při -70°C.

2.6. PŘÍPRAVA GELŮ

Kultivace buněk v prostředí gelů lépe imituje poměry ve tkáni než kultivace na plastovém povrchu. Při přípravě gelů bylo využito dříve publikovaných postupů (Elsdale a Bard 1972, Gillery a spol. 1989), které byly upraveny pro naše podmínky.

2.6.1. Fibrinový gel

Fibrinogen byl navážen podle počtu misek, za míchání rozpuštěn v PBS pH 7,41 a napipetován do Petriho misky o ploše 8 cm². Thrombin byl přidán do koncentrace 0,092 U/1,4 ml gelu). Směs obsahující 1 mg fibrinogenu/ml byla nechána polymerovat 1 - 2 hodiny v CO₂ inkubátoru. Poté byl gel překryt médiem. Další den bylo medium odsáto a na gel byla pipetována buněčná suspence. Buňky během noci adherovaly ke gelu. Byly překryty 0,4 ml roztoku fibrinogenu a polymerace proběhla, jak je popsáno shora. Medium bylo vyměňováno každý den.

2.6.2. Kolagenní gel

Zásobní roztok kolagenu v kyselině octové byl smíchán se 4x koncentrovaným DMEM v poměru 3:1, takže výsledná koncentrace kolagenu byla 0,1%. Dva ml roztoku byly ihned pipetovány do Petriho misek o ploše 8 cm² a ponechány 1 - 2 hodiny polymerovat. Gel byl překryt médiem. Následující den byla na gel napipetována suspence buněk. Adherující buňky byly pak překryty 0,4 ml kolagenu. Medium bylo vyměňováno denně.

2.7. SKLÍZENÍ BUNĚK Z GELŮ PRO IZOLACI RNA (neenzymaticky)

Sklízení buněk bylo prováděno v časovém intervalu 6, 12 a 24 hodin po přidání sledovaných látek (FGF-1 a WX14643) do média buněk kultivovaných v gelu nebo na plastové Petriho misce.

Kontroly

Z misek bylo slito medium. Buňky byly dvakrát opláchnuty PBS a jednou TS pufr. Byl přidán TS pufr, buňky seškrábnuty buněčnou škrabkou a vypláchnuty TS pufr do zkumavky. Ta byla centrifugována 5 minut při 3500 ot./min a 4°C. Supernatant byl dokonale odstraněn, přidán lyzační roztok GTC(+) a buňky byly v roztoku jemně suspendovány.

Buňky v gelech

Z misek bylo slito medium. Buňky byly dvakrát opláchnuty PBS a jednou TS pufr. Gely byly seškrábnuty buněčnou škrabkou do zkumavek Corex. Ty byly centrifugovány 5 minut při 12000 g při 4°C. Supernatant byl dokonale odstraněn a přidán lyzační roztok GTC(+) podle množství vzorku. Poté byla provedena homogenizace ultra-turaxem. Vzorky byly zamrazeny při -70°C nebo bylo pokračováno ve zpracování.

2.8. IZOLACE RNA A MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY RNA

K izolaci RNA byl použit Qiagen RNeasy mini kit. Kit využívá metody, která kombinuje selektivně vazebné vlastnosti membrány na bázi silikagelu s rychlostí microspinové technologie. Specializovaný systém pufrů umožňuje RNA s řetězcem delším než 200 bází, aby se vážala se na silikagelovou membránu. Po přidání ethanolu se vzorek aplikuje na kolonku, kde se celková RNA váže na membránu a kontaminující složky vzorku jsou odmyty.

Postupovalo se podle návodu dodaného výrobcem.

Koncentrace RNA byla měřena v 10 mM TRIS-HCl pH 7,5. Absorbance byla měřena na spektrofotometru BioMate 3 proti blanku při 260 nm. Koncentrace byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{koncentrace } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 40 \cdot \text{absorbance} \cdot \text{zředění} / 1000$$

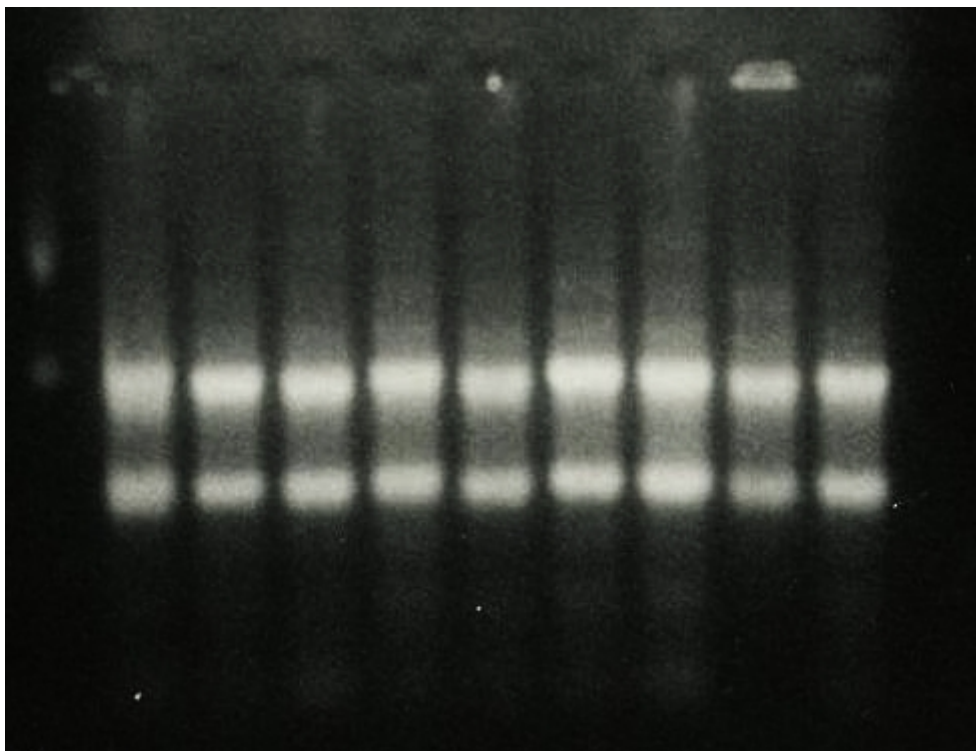
2.9. GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Molekuly se rozdělují na základě pohyblivosti v gelu, která závisí na náboji separované molekuly a její molekulové hmotnosti, intenzitě elektrického pole a typu a porozitě gelu. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě.

Postup:

Byl připraven 1% agarózový gel, do kterého byl ještě za horka přidán formaldehyd (8 ml 37% formaldehydu/100 ml agarózy). Gel byl nalit na elektroforetickou desku se vsunutým hřebínkem a nechán 0,5 h ztuhnout. Poté byl vložen do vany pro horizontální elektroforézu.

Vzorky RNA byly naředěny vodou prostou RNáz (RNase-free) na koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, přidán denaturační pufr v množství minimálně jako množství vzorku a roztok ethidium bromidu. Vzorky byly napipetovány na gel a zahájena elektroforéza při napětí 40 V. Elektroforéza probíhala po dobu 2,5 h. Elektroforeogram byl vyhodnocen na UV transiluminátoru. Hodnocena byla kvalita RNA, tj. proužky ribozomální RNA a nepřítomnost degradačních produktů (viz. Obr. 2.1).



Obr.2.1: Kontrola kvality izolované RNA pomocí agarózové elektroforézy (clona 8, doba expozice 1,5s)

2.10. SYNTÉZA cDNA

Syntéza cDNA (komplementární DNA) byla provedena reverzní transkripcí. Principem je převedení mRNA na cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Reakci začínají „random primery“ (tzv. náhodné primery), které se na základě komplementarity bazí mohou navázat kdekoliv na RNA. Poté je reverzní transkriptázou s pomocí dodaných deoxynukleotid trifosfátů (dNTP) nasyntetizován komplementární řetězec DNA.

Pro syntézu cDNA byl použit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit a k reakci byly využity random primery o délce 6 bazí.

Postup:

Byl připraven premix podle tabulky 2.2 na příslušný počet reakcí s 10% rezervy.

Tabulka 2.2: Premix pro syntézu cDNA – množství na 1 reakci

	1 rce (μl)
10x RT pufr	2.0
25x dNTP směs	0.8
10x Random primery	2.0
Multiscribe RT (50 U/μl)	1.0
Rase-free H ₂ O	4.2
celkem	10.0

RNA byla vodou prostou RNáz (RNase-free) naředěna na koncentraci 1 μg RNA na celkový objem 10 μl. Ke zředěné RNA bylo napipetováno po 10 μl premixu. Vzorky byly umístěny do termocykleru a podrobeny teplotnímu programu: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min, 4°C oo.

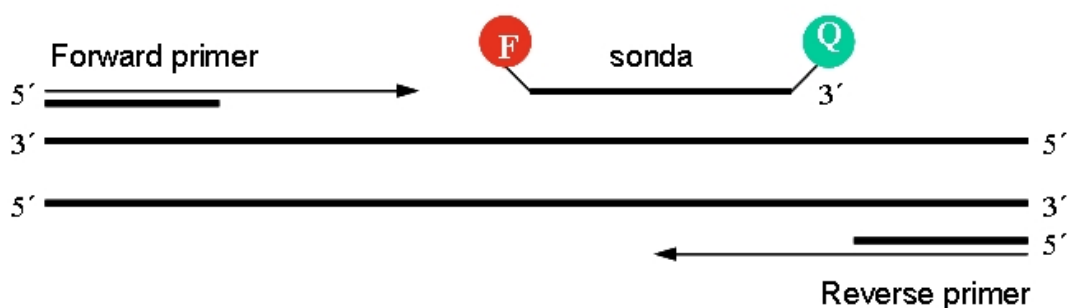
2.11. REAL-TIME RT PCR (rtRT-PCR)

Základním principem PCR (polymerázová řetězová reakce) je amplifikace DNA v opakujících se cyklech, které mají tři kroky:

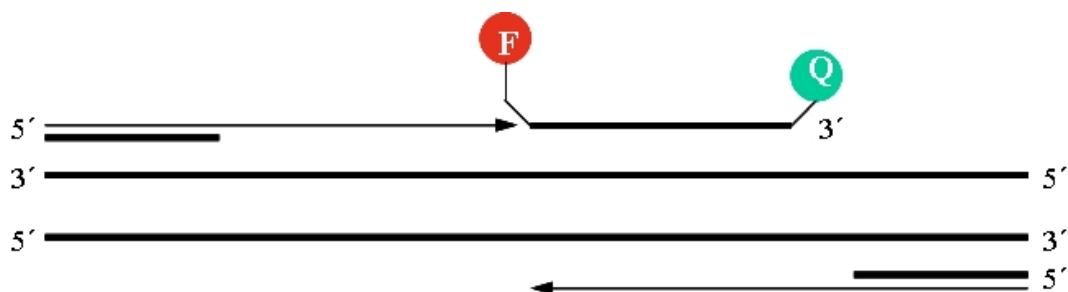
1. denaturace - reakční směs je zahřáta na 94-98°C. Tím dojde k rozrušení vodíkových vazeb mezi komplementárními bazemi dvouvláknové DNA (a primerů), čímž vzniknou jednořetězce DNA.
2. annealing – teplota reakční směsi je snížena na 50-65°C. Primery (specifické oligonukleotidy), které jsou v reakční směsi v nadbytku, se navážou na základě komplementarity bazí na jednovláknový DNA templát. DNA polymeráza se naváže na DNA s navázaným primerem a začne syntézu nového řetězce DNA.
3. elongace – teplota tohoto kroku závisí na použité DNA polymeráze. V tomto kroku DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec DNA komplementární k templátu. Na základě komplementarity bazí připojuje na rostoucí konec templátu deoxynukleotid trifosfáty ve směru 5' - 3'.

Metoda real-time PCR (tzv. PCR v reálném čase) je založená na měření množství PCR produktu v průběhu amplifikace. K přesné kvantifikaci amplikonů se používá sondy značené fluorescenčním barvivem. V současnosti je asi nejvíce rozšířená

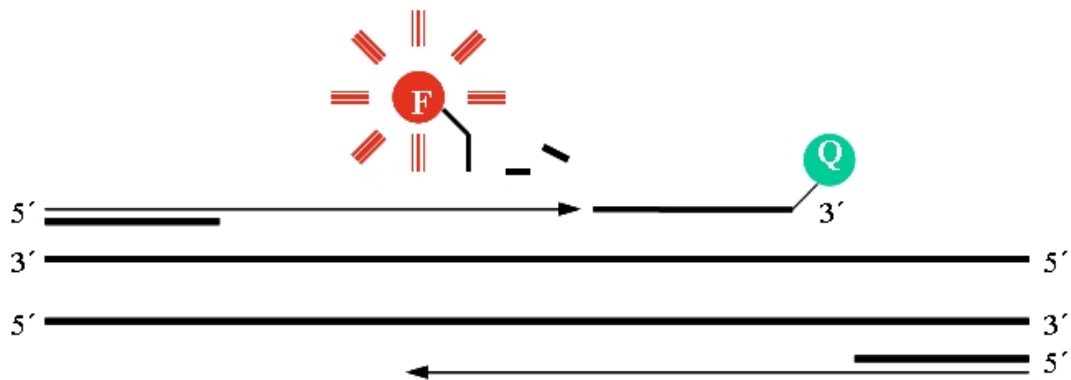
metoda využívající 5'-exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidové sondy (nejčastěji sonda TaqMan), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci značena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášecím fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase (viz. Obr. 2.2 – 2.5) (zdroj: lem.ocol.cz).



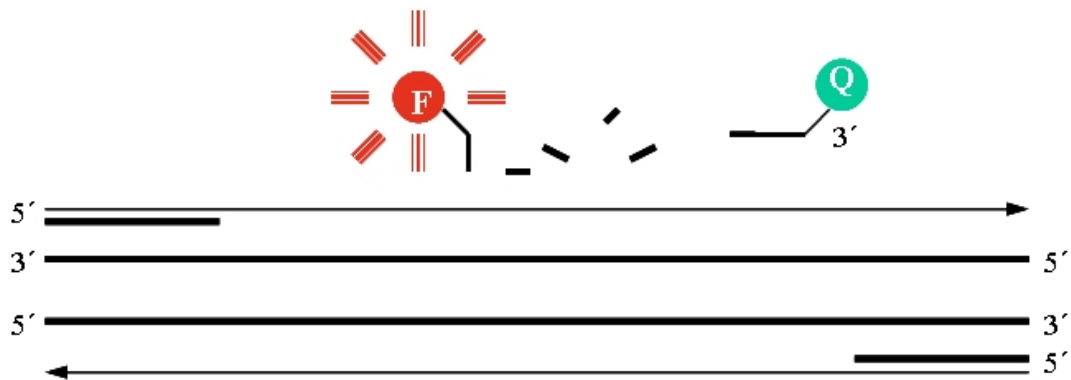
Obr. 2.2: Fluorescenční substrát (F) a jeho zhášec (Q) jsou navázány na 3' a 5' konce TaqMan sondy.



Obr. 2.3: Elongace řetězce: TaqMan polymeráza prodlužuje řetězec ve směru 5'-3'. Dokud je sonda navázána na řetězec cDNA, záření emitované fluorescenčním substrátem je pohlcováno zhášecem.



Obr. 2.4: Když TaqMan polymeráza dorazí k sondě, postupně ji odbourává, až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášedce a detekovaná fluorescence stoupá.



Obr. 2.5: Polymerizace je dokončena.

Kvantitu lze stanovit absolutně za použití standardů o známé koncentraci nebo relativně. Pro naše stanovení jsme použili bezrozměrnou absolutní kvantifikaci s vyhodnocením míry exprese pomocí kalibračních křivek pro každý stanovovaný gen. Vždy je třeba použít vnitřní kontrolu - referenční tzv. house keeping gen (provozní gen, gen se stabilní expesí), jehož cDNA je amplifikována společně se stanovovaným genem.

Výpočty míry exprese cílového (target) genu a odpovídajícího house keeping genu jsou založeny na určení cyklu, tzv. Ct (cycle threshold), při kterém oba geny dosáhnou stejné úrovně fluorescence.

Postup:

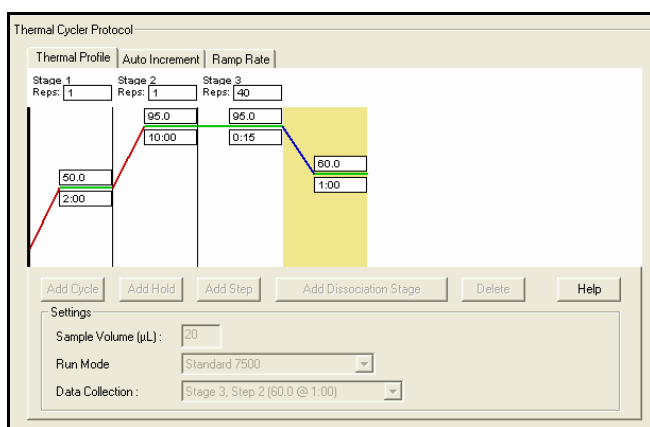
Pro real-time PCR byl použit TaqMan Universal PCR Master Mix a jako sondy TaqMan Gene Expression Assays. Jako house keeping gen (endogenní kontrola) byl použit gen 18S RNA.

cDNA byla naředěna 1:10, jeden ze vzorků byl použit pro sestavení kalibrační řady (kvantita byla položena rovna jedné) a dále naředěn 1:100 a 1:1000 (kvantita pak rovna 0,1 resp 0,01). Master mix byl namíchán se sondou a zředěnou cDNA v poměru uvedeném v tabulce č. 2.3. Jako negativní kontrola byl použit master mix se sondou a injekční voda místo vzorku cDNA.

Tabulka 2.3: Premix pro syntézu rtRT-PCR – množství na 1 reakci

	1 reakce (μl)
2x Taqman Master Mix	10
1. proba + primery	1
naředěná cDNA + H ₂ O	9
celkem	10

Připravený master mix byl rozpipetován po 11 μl na jamku. Naředěná cDNA byla rozpipetována po 9 μl na jamku v duplikátech. Deska se vzorky byla vložena do termocykleru pro rtRT-PCR 7500 Fast a byl spuštěn tepelný program ve standardním modu (viz. Obr. 2.6).



Obr. 2.6: Teplotní profil reakce

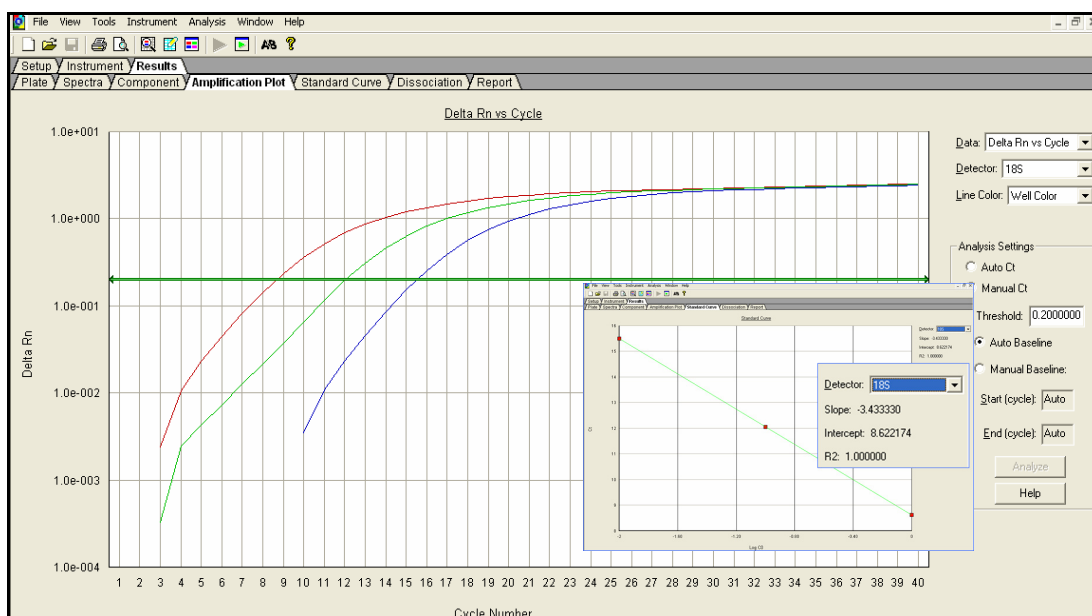
Vyhodnocení výsledků:

K vlastní analýze byl použit 7500 Fast System SDS Software. Po skončení PCR reakce byla provedena základní analýza dat - nastavení úrovně fluorescence tzv.

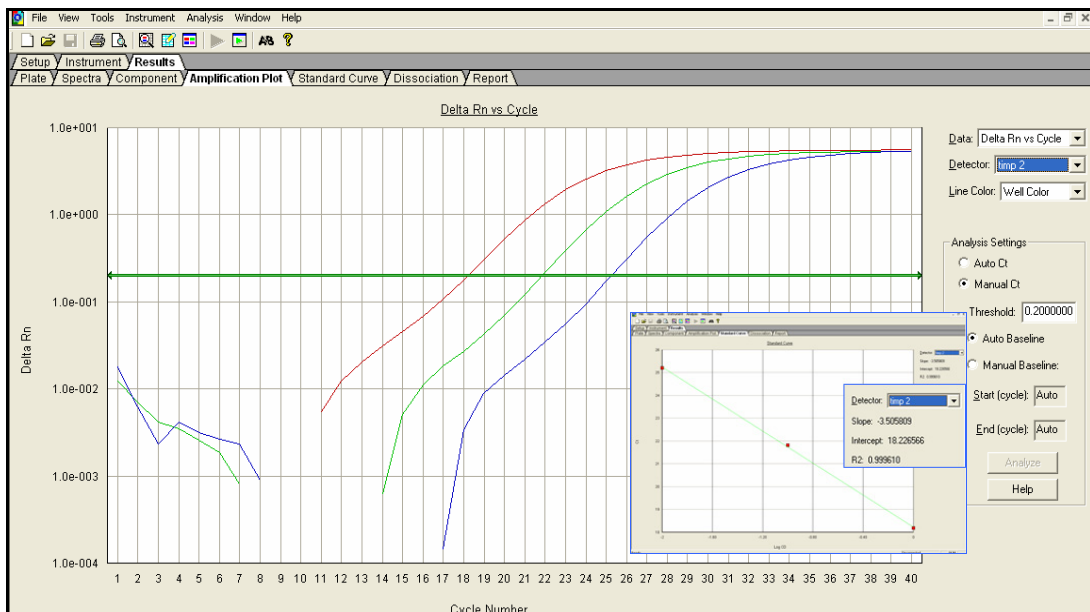
threshold (v našem případě 0,2). Threshold nastavujeme tak aby ležel v logaritmické části křivky nárůstu produktu, nebo při logaritmickém znázornění zhruba v půlce výšky křivky (viz. Obr. 2.7 – 2.9). Oddělení šumu a signálu (tzv. base line) bylo nastaveno automaticky. Software na základě kalibračních křivek vypočítal hodnoty Ct a následně relativní kvantitu exprese daného genu ve vzorcích. Výsledná hodnota exprese se počítala podle vzorce:

$$\text{výsledná kvantita} = \frac{\text{relativní kvantita stanovovaného genu}}{\text{relativní kvantita 18s RNA}}$$

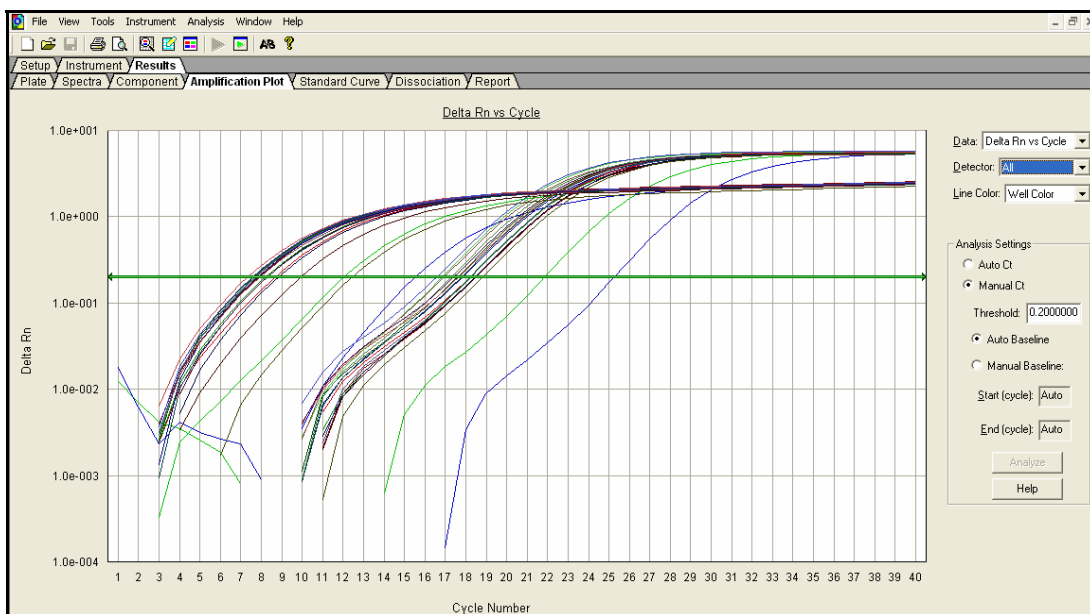
Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel, ve kterém byl provedena i statistická analýza dat pomocí Studentova t-testu ($p \leq 0,05$).



Obr. 2.7: Kalibrační křivka 18s RNA



Obr. 2.8: Kalibrační křivka genu Timp2



Obr. 2.9: Křivky nárůstu produktů jednotlivých genů

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimenty jsme prováděli na kultuře jaterních myofibroblastů získaných opakovaným pasážováním neparenchymové buněčné frakce z jater potkanů. K pokusům byli použiti samci kmene Sprague-Dawley o hmotnosti 450 – 550 g. Játra byla po perfuzi enzymy vyjmuta a směs neparenchymových buněk byla izolována centrifugací na hustotním gradientu.

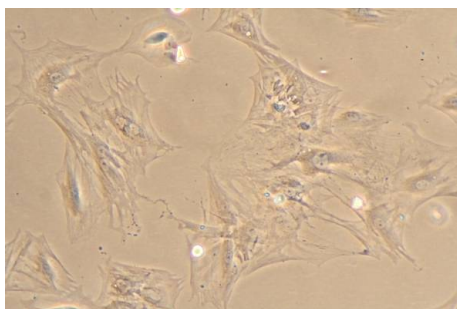
Testované látky FGF-1 a WY-14643 v koncentracích 10 ng/ml a 100 nM (Nakamachi a spol. 2007) byly přidány k buňkám na plastu a v kolagenním gelu. Nejprve jsme se zaměřili na sledování vlivu těchto látek na buňky vysazené na plastové misky ve třech intervalech 6, 12 a 24 hodin. Sledovali jsme případné změny v morfologii buněk, následně jsme izolovali RNA a sledovali expresi 14 genů. Pokusy byly prováděny na buňkách kultivovaných v bezsérových podmínkách.

V druhé části pokusu jsme se věnovali studiu exprese genů u jaterních myofibroblastů kultivovaných v kolagenním gelu opět po přidání WY a FGF. Díky časové a technické náročnosti přípravy gelů jsme se vybrali pouze jeden časový interval a to 12 hodin, kdy změny na plastu byly maximální.

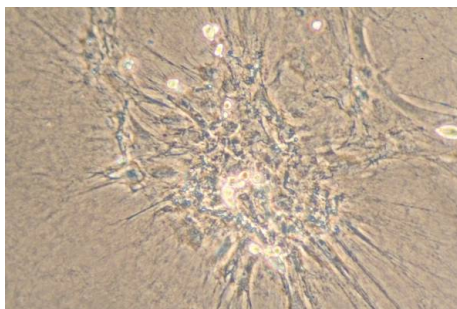
4. VÝSLEDKY

4.1. MORFOLOGIE BUNĚK

Obr. 4.1 a 4.2. ukazují myofibroblasty 24 hodin po 4. pasáži vysazené na polystyrenovou misku, respektive přenesené do kolagenního gelu. MFB kultivované na plastu rostou volně rozprostřeny po dnu plastové Petriho misky, mají velké tělo s velkým jádrem a patrnými jadérky. MFB kultivované v kolagenním gelu mají menší protáhlé tělo s dlouhými cytoplazmatickými výběžky a mají tendenci se shlukovat.



Obr. 4.1: MFB kultivované na plastu 24hod, zvětšení 100x



Obr. 4.2: MFB kultivované v kolagenním gelu 24hod, zvětšení 100x

4.2. EXPRESE GENŮ NA PLASTU

V tabulkách č. 4.1 a 4.2 jsou uvedeny průměrné hodnoty relativní exprese 14 genů v procentech, kontrolní buňky na plastu bez ovlivnění jsou brány jako 100%. V tabulce je uveden vždy průměr ± SEM (standardní chyba průměru).

Tabulka č. 4.1: Expresse genů na plastu - ovlivnění růstovým faktorem FGF-1

	Gen	6hod	12hod	24hod
Metaloproteinázy, inhibitory, inhibitor aktivátoru	Mmp-2	86 ± 3	85 ± 10	90 ± 4 ^a
	Mmp-3	162 ± 9 ^a	172 ± 45	141 ± 23
	Mmp-7	97 ± 10	98 ± 17	138 ± 12 ^a
	Mmp-9	100 ± 13	84 ± 16	121 ± 23
	Mmp-13	252 ± 41	341 ± 41 ^a	105 ± 18
	Timp-1	102 ± 4	129 ± 5 ^a	102 ± 9
	Pai-1	170 ± 20	228 ± 95	122 ± 30
Cytokiny	Tgf-β1	116 ± 6	120 ± 5 ^a	98 ± 8
	Ctgf	91 ± 3	92 ± 4	92 ± 3 ^a
Proteiny a proteoglykany	Col1a2	96 ± 5	86 ± 8	104 ± 6
	Tsp-2	105 ± 2	127 ± 37	91 ± 10
	Spp	109 ± 2	91 ± 8	94 ± 7
	Lum	82 ± 4	69 ± 6 ^a	72 ± 3 ^a
	Has-2	163 ± 17	133 ± 13	116 ± 16
n		2	4	4

^a statisticky významná změna exprese genu ($p \leq 0,05$)

n počet hodnot použitých pro výpočet průměru

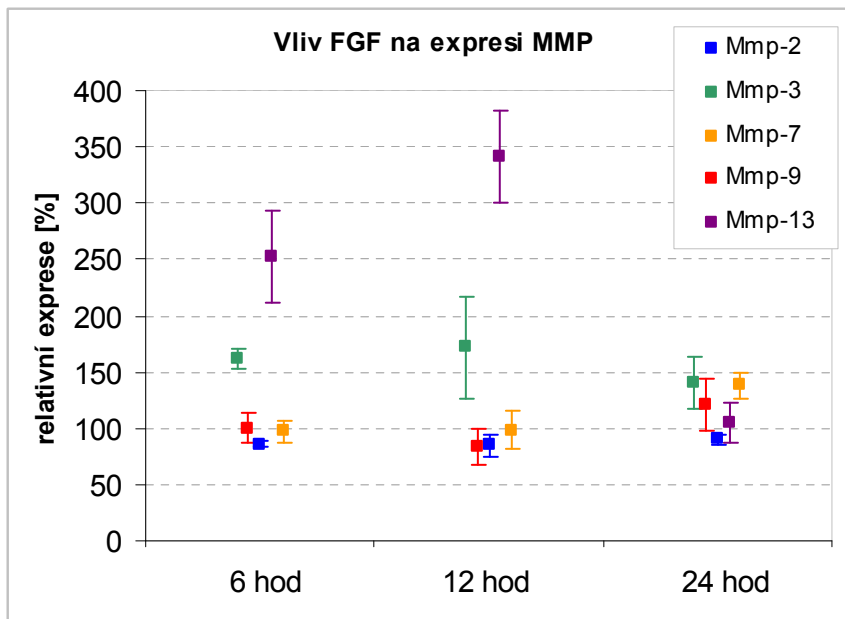
Tabulka č. 4.2: Expresie genů na plastu - ovlivnění WY-14643

	Gen	6hod	12hod	24hod
Metaloproteinázy, inhibitory, inhibitor aktivátoru	Mmp-2	85 ± 10	104 ± 7	93 ± 6
	Mmp-3	126 ± 6	198 ± 35 ^a	162 ± 42
	Mmp-7	110 ± 4	118 ± 9	80 ± 15
	Mmp-9	101 ± 16	58 ± 15 ^a	74 ± 7 ^a
	Mmp-13	137 ± 25	345 ± 123	135 ± 34
	Timp-1	105 ± 12	111 ± 3 ^a	92 ± 11
	Pai-1	113 ± 29	146 ± 65	103 ± 21
Cytokiny	Tgf-β1	100 ± 9	101 ± 6	96 ± 7
	Ctgf	83 ± 18	78 ± 1 ^a	114 ± 8
Proteiny a proteoglykany	Col1a2	93 ± 5	91 ± 7	95 ± 2 ^a
	Tsp-2	95 ± 20	128 ± 29	99 ± 8
	Spp	96 ± 1 ^a	84 ± 4 ^a	99 ± 6
	Lum	92 ± 5	86 ± 11	130 ± 20
	Has-2	88 ± 12	128 ± 8 ^a	82 ± 8
n		2	3	3

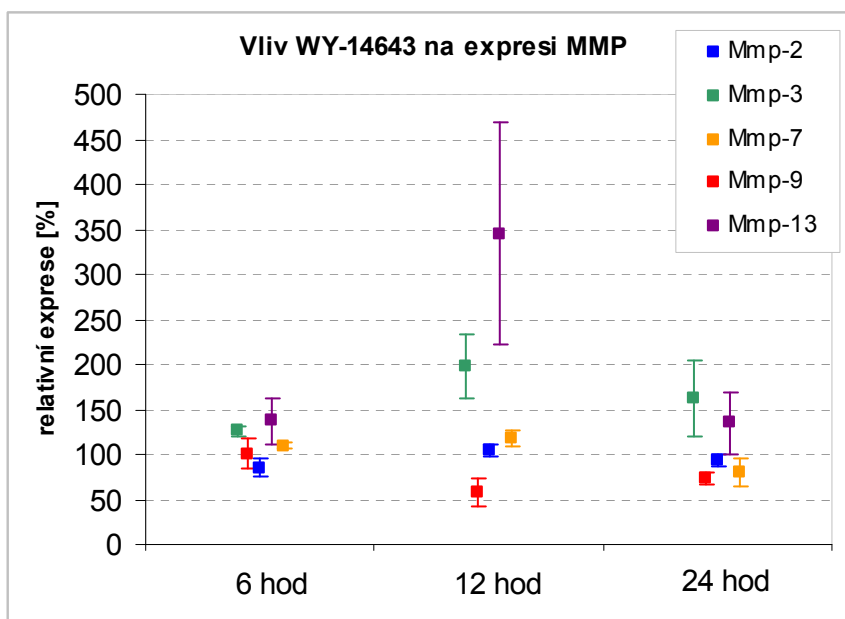
^a statisticky významná změna exprese genu ($p \leq 0,05$)

n počet hodnot použitých pro výpočet průměru

Z tabulek 4.1 a 4.2 je zřejmé, že k největším změnám v expresi MMP u buněk kultivovaných na plastu ovlivněných FGF-1 a WY-14643 došlo ve 12tíhodinovém intervalu. FGF-1 vyvolal největší změny v expresi MMP-3 a -13 a v expresi inhibitoru PAI-1, kde je zvýšení dvoj- až trojnásobné. Kyselina pirixinová ovlivnila buňky kultivované na plastu podobným způsobem, jen exprese MMP-9 byla po 12 hod. snížena. FGF-1 způsobil malé, ale všech intervalech se opakující snížení exprese lumikanu, zatímco exprese hyaluronansyntázy 2 byla mírně zvýšena.

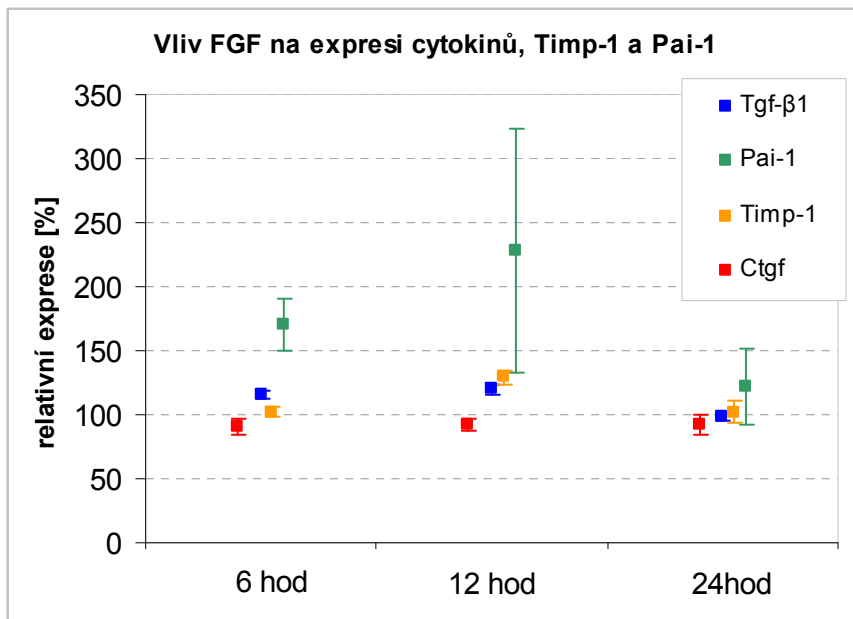


Graf 4.1: Vliv FGF-1 na expresi matrixových metaloproteináz (MMP)

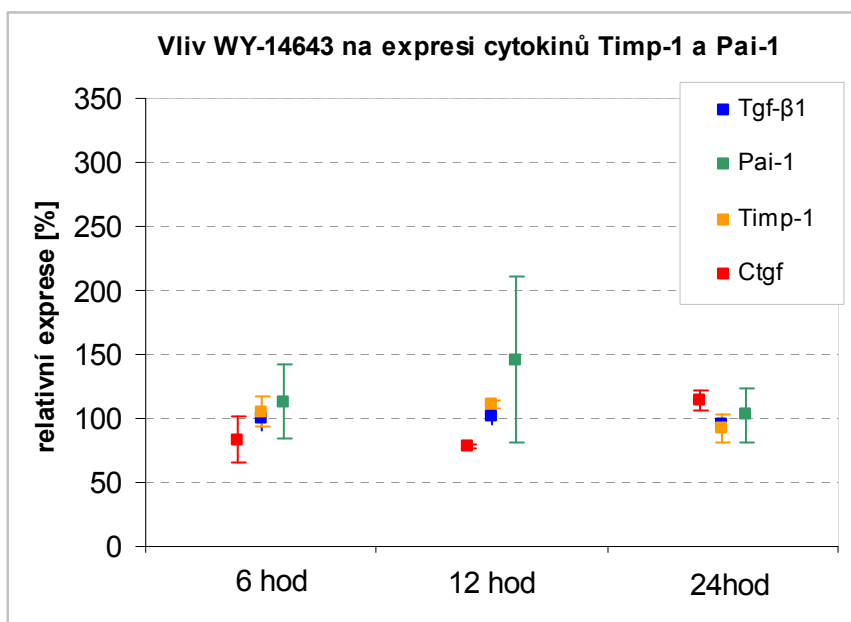


Graf 4.2: Vliv WY-14643 na expresi matrixových metaloproteináz (MMP)

Jiné možné vyjádření výsledků je grafické. Z grafů 4.1 a 4.2 je zřejmé, že k největším změnám v expresi MMP u buněk kultivovaných na platu ovlivněných FGF-1 a WY-14643 došlo ve 12hodinovém intervalu. FGF-1 vyvolal největší změny v expresi MMP-3 a -13. Kyselina pirixinová ovlivnila buňky kultivované na platu podobným způsobem, jen exprese MMP-9 byla po 12 hod. snížena.

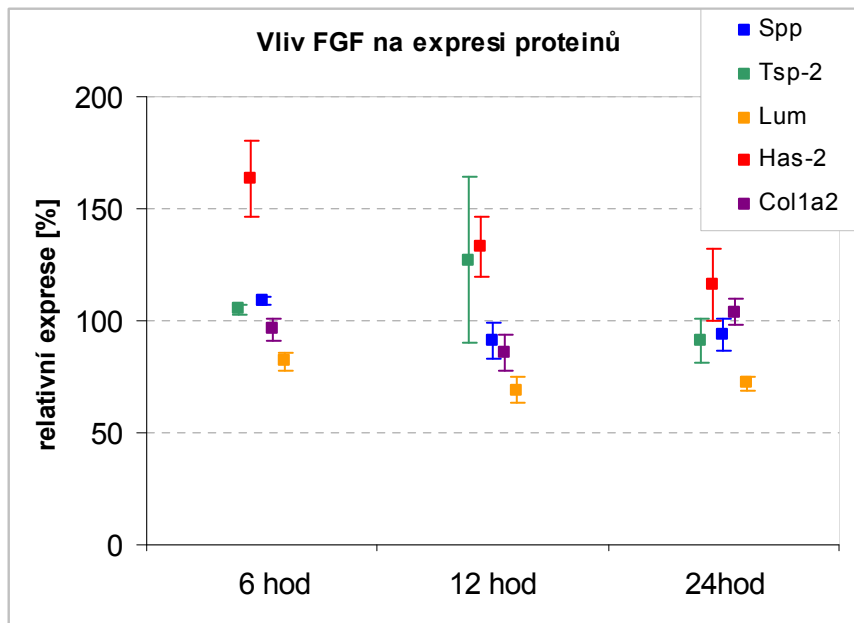


Graf 4.3: Vliv FGF-1 na expresi cytokinů, TIMP-1 a Pai-1

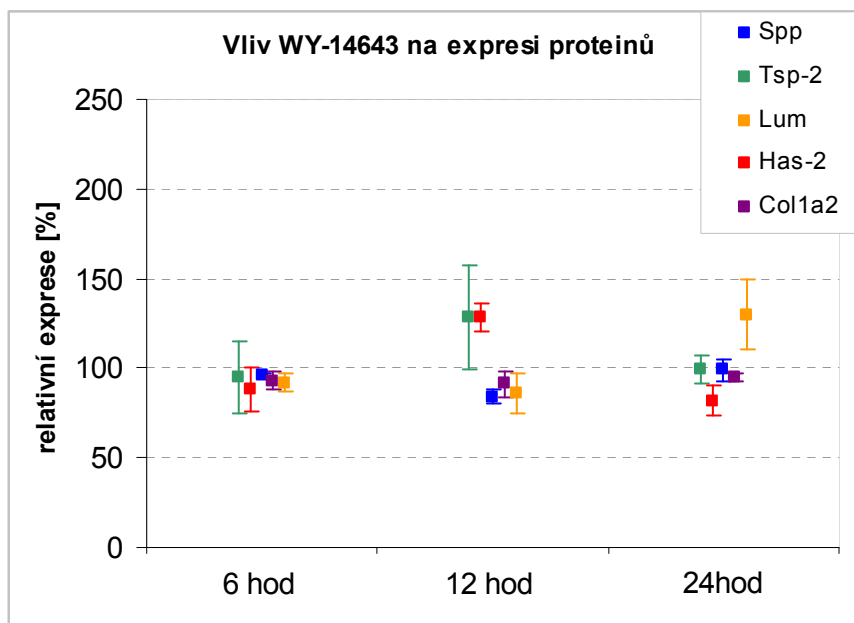


Graf 4.4: Vliv WY-14643 na expresi cytokinů, TIMP-1 a Pai-1

Z grafů 4.3 a 4.4 je zřejmé, že k největším změnám v expresi cytokinů a TIMP-1 a PAI-1 u buněk kultivovaných na platu ovlivněných látkami FGF-1 a WY-14643 docházelo opět ve 12 hodinovém intervalu. Největší změny exprese vykazoval inhibitor PAI-1, u kterého bylo zvýšení přibližně dvojnásobné. Změny v expresi Pai-1 byly výraznější v případě ovlivnění růstovým faktorem FGF-1.



Graf 4.5: Vliv FGF-1 na expresi proteinů



Graf 4.6: Vliv WY-14643 na expresi proteinů

Z grafů 4.5 a 4.6 je patrné, že k největší změně v expresi genů u buněk kultivovaných na plastu ovlivněných látkami FGF-1 a WY-14643 ve 12. hodinovém intervalu. Největší nárůst v expresi po působení FGF-1 i WY-14643 vykazoval Tsp-2 a Has-2. Malé, ale ve všech intervalech se opakující snížení exprese bylo pozorováno u lumikanu, které bylo výraznější po působení FGF-1.

4.3. EXPRESE GENŮ V KOLAGENNÍM GELU

V tabulkách č. 4.3 a 4.4 jsou uvedeny průměrné hodnoty relativní exprese 14 genů v procentech, kontrolní buňky v kolagenním gelu bez ovlivnění jsou brány jako 100%. V tabulce je uveden vždy průměr \pm SEM (standardní chyba průměru).

Tabulka č. 4.3: Exprese genů v kolagenním gelu - ovlivnění látkami FGF-1 a WY-14643

	Gen	FGF-1	WY-14643
Metaloproteinázy, inhibitory, inhibitor aktivátoru	Mmp-2	133 \pm 24	363 \pm 167
	Mmp-3	304 \pm 64	267 \pm 54
	Mmp-7	128 \pm 26	248 \pm 107
	Mmp-9	233 \pm 73	332 \pm 134
	Mmp-13	341 \pm 64 ^a	481 \pm 208
	Timp-1	139 \pm 26	432 \pm 232
	Pai-1	158 \pm 25	158 \pm 81
Cytokiny	Tgf- β 1	104 \pm 14	148 \pm 61
	Ctgf	149 \pm 30	425 \pm 215
Proteiny a proteoglykany	Col1a2	118 \pm 12	181 \pm 66
	Tsp-2	151 \pm 29	214 \pm 102
	Spp	159 \pm 13 ^a	621 \pm 361
	Lum	105 \pm 21	174 \pm 58
	Has-2	118 \pm 15	367 \pm 102
n		3	3

^a statisticky významná změna exprese genu ($p \leq 0,05$)

n počet hodnot použitých pro výpočet průměru

Z tabulky č. 4.3 je patrné, že působení FGF-1 a zejména WY-14643 na expresi sledovaných genů bylo v buňkách pěstovaných v kolagenním gelu výraznější než tomu bylo u buněk na platu. Kromě proteáz MMP-3 a -13 došlo ke zvýšení MMP-2, -7 i -9. Kyselina pirixinová podstatně ovlivnila ještě expresi inhibitoru TIMP-1,

cytokinu CTGF, proteinů a proteoglykanů extracelulární matrix a hyaluronan syntázy, která je lokalizovaná v plasmatické membráně. Jde o zvýšení v desítkách až stovkách procent, největší zvýšení bylo zaznamenáno u osteopontinu, přibližně na šestinásobek.

Tabulka č. 4.4: Expese genů v kolagenním gelu - ovlivnění látkami FGF-1 a WY-14643

	Gen	0	FGF-1	WY-14643
Metaloproteinázy, inhibitory, inhibitor aktivátoru	Mmp-2	251 ± 16	322 ± 36	904 ± 420
	Mmp-3	203 ± 24	573 ± 49 ^a	503 ± 39 ^a
	Mmp-7	5 ± 2	6 ± 2	7 ± 1
	Mmp-9	10 ± 4	16 ± 5	19 ± 3
	Mmp-13	323 ± 109	908 ± 213	933 ± 13 ^a
	Timp-1	37 ± 10	48 ± 10	104 ± 34
	Pai-1	42 ± 13	71 ± 27	59 ± 26
Cytokiny	Tgf-β1	139 ± 21	218 ± 71	471 ± 168
	Ctgf	149 ± 37	167 ± 53	261 ± 130
Proteiny a proteoglykany	Col1a2	115 ± 12	133 ± 17	225 ± 101
	Tsp-2	112 ± 37	196 ± 94	251 ± 113
	Spp	15 ± 7	26 ± 14	40 ± 10
	Lum	250 ± 42	249 ± 43	507 ± 241
	Has-2	64 ± 10	72 ± 2	207 ± 32
n		3	3	3

^a statisticky významná změna expese genu ($p \leq 0,05$)

n počet hodnot použitých pro výpočet průměru

Tabulka 4.4, kde za 100% bylo vzata expese genů na plastu, ukazuje, jak rozdílné může být hodnocení účinku látek, jestliže se jejich účinnost zkoumá v 3D kultuře, za podmínek bližších stavu ve tkáni.

5. DISKUSE

V této diplomové práci jsme studovali vliv kultivačního prostředí na expresi genů v jaterní myofibroblastech potkanů. Srovnávali jsme běžný způsob kultivace buněk na polystyrenových Petriho miskách s kultivací v trojrozměrném (3D) prostředí. Tímto prostředím byl fibrinový nebo kolagenní gel. Sledovali jsme vliv dvou rozdílných látek, růstového faktoru FGF-1, který se přirozeně vyskytuje ve tkáních, a syntetické látky, kyseliny pirixinové, běžně označované kódem WY-14643. Buňky byly izolovány z jater potkanů, podrobeny 4 pasážím a pak vysazeny buď znovu na plast anebo do sendviče vytvořeného ze dvou vrstev gelu.

Jde o pilotní studii, která měla ukázat, jestli a do jaké míry je působení těchto dvou biologicky aktivních látek různého charakteru závislé na prostředí, které jaterní MFB obklopuje. Studované buňky jsou jedním z typů buněk, které se uplatňují při vzniku jaterní fibrózy a jsou relativně snadno dostupné z jater normálních potkanů. Předběžné pokusy ukázaly, že exprese genů studovaná pomocí cDNA arrayí v těchto MFB se shoduje s expresí genů v portálních myofibroblastech izolovaných jinou nezávislou metodikou z jater potkanů s počínající biliární fibrózou (Jiroutová a spol., nepublikované výsledky).

Koncentraci obou látek jsme zvolili podle dostupné literatury. Pro optimální výsledek jsme studovali expresi genů na plastech ve třech časových intervalech, 6, 12 a 24 hodin. Nejvýraznější změny jsme zaznamenali po 12 hodinách působení obou látek a tohoto intervalu jsme se proto přidrželi. Jako 3D prostředí jsme zkoušeli fibrinový gel, protože fibrinová ložiska se vytvářejí v játrech poškozených různými způsoby, pravděpodobně jako počátek fibrotických změn (Neubauer et al. 1995, Luyendyk et al. 2004). Větších změn po aplikaci obou látek jsme ale docílili při použití gelu tvořeného kolagenem typu I, který jsme izolovali z ocasních šlach potkanů, a proto jsme se po počátečních pokusech (výsledky nejsou uvedeny) věnovali jen gelům kolagenním.

Interakce složek ECM, například kolagenu, s integriny vede ke změnám konformace proteinových řetězců, které je tvoří a k redistribuci integrinů v plasmatické membráně. Integriny vytvářejí shluky a tyto změny se zpětně odrážejí v terciární struktuře bílkoviny. Uvnitř buňky dochází k reorganizaci cytoskeletu.

Růstové faktory rovněž interagují s buňkou prostřednictvím specifických receptorů. Tyto receptory se mohou asociovat s integriny a tím může dojít ke změně signálů, které jsou vysílány do buňky (Ross 2004).

Expresí genů v buňkách *in vitro* se studuje v různých systémech. Například syntéza kolagenu v lidských kožních fibroblastech je ovlivněna jak podmínkami kultivace, v jednoduché vrstvě nebo v 3D prostředí kolagenního gelu, tak látkami přidanými do kultivačního media. Askorbát, retinoidy i růstové faktory TGF- β a FGF-2 působí na inkorporaci prekursorů do kolagenu různě podle prostředí, v němž se buňky nacházejí (Geesin a spol. 1993). Pouhé potažení kultivační nádoby kolagenem může mít někdy vliv na expresi genů kódujících různé složky matrix (Ortega-Velazquez a spol. 2004) ovšem 3D struktura je bližší poměrům ve tkáni (Cukierman a spol. 2001).

Fetální hovězí sérum běžně přidávané do kultivačních medií stimuluje dělení buněk, například buněk hladkého svalstva izolovaných z prasečí aorty. Kolagenní matrix tlumí účinek séra i růstového faktoru PDGF přidaného do media (Thie a spol. 1993). V našich pokusech jsme v rozhodující fázi pokusu (už 24 hod. před přidáním látek) sérum vyloučili nebo jeho koncentraci v gelech postupně omezili.

Růstový faktor FGF-1 v koncentraci 1 až 10 ng/ml media stimuluje v buňkách hladkého svalstva expresi všeobecně rozšířené složky ECM osteopontinu (Li a spol. 2002). Má asi také určitou úlohu při vzniku jaterní fibrózy. Při podávání tetrachlormethanu myším se nedostatek FGF-1 a FGF-2 příznivě projevil sníženou expresí kolagenu I (Yu a spol. 2003). Podle našich znalostí jeho účinky na buňky kultivované v trojrozměrné matrix dosud zkoumány nebyly. V našich pokusech při kultivaci MFB na plastu stimuloval FGF-1 expresi metaloproteináz MMP-3 a MMP-13, přičemž byla ale zvýšena i exprese aktivátorového inhibitoru PAI-1. Účinek FGF-1 na buňky v kolagenním gelu byl širší, zvýšena byla například i exprese MMP-9.

Jakožto ligand PPAR α , zasahuje WY-14643 do metabolismu lipidů. Může do značné míry normalizovat steatózu a další patologické změny v játrech vyvolané podáváním methionin a cholin deficientní (MCD) potravy myším. Ligand WY-14643 přidaný do této diety snižuje expresi kolagenu I a v celkovém výsledku i jaterní fibrózu. Expresí kolagenázy a želatináz se přitom nezvyšuje (Ip a spol. 2004).

WY-14643 podstatně snížil fibrózu u potkanů, kterým byl podáván thioacetamid. Autoři přičítají tento výsledek antioxidačnímu působení katalázy (Toyama a spol. 2004).

V našich pokusech byl patrný značný vliv WY-14643 na expresi metaloproteáz . Na platu to byly MMP-3 a -13, v kolagenním gelu potom i další. Podstatně byla ale stimulována také exprese inhibitoru TIMP-1. Z proteinů matrix byl ovlivněn zejména osteopontin a thrombospondin-2, z cytokinů růstový faktor CTGF. V celých játrech se může daleko více projevit exprese genů ve hvězdicových buňkách, zatímco myofibroblasty tvoří početní menšinu. Účinek WY-14643 na jejich subpopulaci může být rozdílný. Rovněž vliv koncentrace je obtížné porovnávat při pokusech *in vivo* a *in vitro*.

Výsledky obsažené v této studii naznačují, že FGF-1 i WY-14643 můžou ovlivnit expresi metaloproteináz a dalších proteinů v myofibroblastech, které mají svou úlohu při vzniku jaterní fibrózy. Aktivita MMP může přitom hrát velkou roli při reverzibilitě fibrotických změn. Naše výsledky je třeba rozšířit na větší počet stanovení a expresi na úrovni mRNA, kterou jsme studovali, je třeba ověřit na úrovni bílkovin. Je nutno se také zjistit, jak závisí účinek obou látek na jejich koncentraci.

ZÁVĚR

Naše práce ukázala, že růstový faktor FGF-1 a ligand PPAR α WY-14643 ovlivňují expresi genů jaterních myofibroblastů. Byla zjištěna časová závislost působení těchto látek na buňky kultivované na plastové Petriho misce. Také byl zaznamenán výrazný rozdíl v působení FGF-1 a WY-14643 na buňky kultivované na plastové Petriho misce a na buňky kultivované v 3D prostředí kolagenního gelu. Při srovnání exprese genů buněk kultivovaných v gelech s buňkami na plastu je patrná kumulace vlivu gelu a použitých činidel.

Otázka možné reverzibility jaterní fibrózy může být vyřešena díky aktivitě enzymů schopných degradovat patologickou ECM, zejména matrixových metaloproteináz. Proto by účinky námi použitých látek ovlivňujících expresi genů v jaterních MFB měly být dále zkoumány.

LITERATURA

- [1] Anderlová K., Doležalová R., Haluzík M. PPAR- α a inzulínová senzitivita. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa* 1/2006 11-15.
- [2] Ankoma-Sey V., Matli M., Chang K.B., Lalazar A., Donner D.B., Wong L., Warren R.S., Friedman S.L., Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998;17:115–121. Převzato ze Sato a kol. 2003
- [3] Benyon R., Iredale J., Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000;46:443–446.
- [4] Bioulac-Sage P, Lafon M.E., Saric J., Balabaud C., Nerves and perisinusoidal cells in human liver. *J Hepatol* 1990;10:105-112.
- [5] Burgess H.A., Daugherty L.E., Thatcher T.H., Lakatos H.F., Ray D.M., Redonnet M., Phipps R.P., Sime P.J., PPAR γ agonists inhibit TGF- β induced pulmonary myofibroblasts differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L1146-L1153.
- [6] Cassiman D., Libbrecht L., Desmet V., Deneef C., Roskams T., Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-9.
- [7] Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M., Taking Cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001;294:1708-1712.
- [8] Czaja M.J., Geerts A., Xu J., Schmiedeberg P., Ju Y., Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *J Leukoc Biol* 1994;55:120-126.
- [9] Elsdale T., Bard J., Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972;54:626-637.
- [10] Friedman S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
- [11] Friedman S.L., Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008;88: 125-172.

- [12] Geesin J.C., Gordon J.S., Berg R.A., Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium and magnesium salts of ascorbyl-2-phosphate. *Skin Pharmacol* 1993;6(1):65-71.
- [13] Gillery P., Bellon G., Coustry F., Borel J.P., Cultures of fibroblasts in fibrin lattices: models for the study of metabolic activities of the cells in physiological conditions. *J Cell Physiol* 1989;140:483-90.
- [14] Han Y.P., Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:S88-S91.
- [15] Houglum K., Venkataramani A., Lyche K., Chojkier M., A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;113:1069-1073.
- [16] Chojkier M., Houglum K., Lee K.S., Buck M., Long- and short-term D- α -tocopherol supplementation inhibits liver collagen $\alpha 1(I)$ gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998;275:G1480-G1485.
- [17] Iimuro Y., Brenner D.A., Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res* 2008;25(2):249-258.
- [18] Ip E., Farrell G.C., Robertson G., Hall P., Kirsch R., Leclercq I., Central role of PPAR- α dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123-132.
- [19] Ip E., Farrell G., Hall P., Robertson G., Leclercq I., Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004;39:1286-96.
- [20] Issemann I., Green S., Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-650. Převzato z Toyama a spol. 2004
- [21] Jarnagin W.R., Rockey D.C., Koteliansky V.E., Wang S.S., Bissell D.M., Expression of variant fibronectin in wound-healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994;127, 2037-2048.
- [22] Jezequel A.M., Novelli G., Venturini C., Orlandi F., Quantitative analysis of the perisinusoidal cells in human liver; the lipocytes. *Front Gastrointest Res* 1984; 8:85-90. Převzato ze Sato a kol. 2003.

- [23] Jiroutová A., Majdiaková L., Čermáková M., Köhlerová R., Kanta J., Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver. *Acta Medica* 2005;48:137-144.
- [24] Jiroutova A., Slavkovsky R., Cermakova M., Majdiakova L., Hranovcova I., Bolehovska R., Hajzlerova M., Radilova H., Ruzsova E., Kanta J., Expression of mRNA related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol* 2007;58:263-273.
- [25] Kallwitz E.R., McLachlan A., Cotler S.J., Role of peroxisome proliferator activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2008;14: 22-28
- [26] Kim K.Z., Rhim T., Choi I., Kim S.S., N-acetylcysteine induces cell cycle arrestin hepatic stellate cells throughits reducing activity. *J Biol Chem* 2001;275:40591-40598.
- [27] Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., Ramadori G., Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: Different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999a;117:1205-21.
- [28] Li D., Friedman S.L., Liver fibrogenesis and role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *J Gastoenterol Hepatol* 1999;14:618-633.
- [29] Li D., Friedman S.L.: Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 2001:455-468.
- [30] Li G., Oparil S., Kelpke S.S., Chen Y.F., Thopson J.A., Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation* 2002;106:854-859.
- [31] Lotersztajn S., Julien B., Texeira-Clerc F., Grenard P., Mallat A., Hepatic fibrosis: Molecular mechanism and drug targets. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:605-628.
- [32] Luyendyk J.P., Maddox J.F., Green C.D., Role of hepatic fibrin idiosyncrasy-like live injury from lipopolysaccharide-ranitide coexposure in rats. *Hepatology* 2004;40:1342-1351.

- [33] Maher J.J., Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 1993;91:2244-2252.
- [34] Maher J.J., Leukocytes as modulators of stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:917-921.
- [35] Marra F., Efsen E., Romanelli R.G., Caligiuri A., Pastacaldi S., Batignani G., Bonacchi A., Caporale R., Laffi G., Pinzani M., Gentilini P., Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor γ modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466-478.
- [36] Marsden E.R., Hu Z., Fujio K., Nakatsukasa H., Thorgeirsson S.S., Evarts R.P., Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab Invest* 1992;67:427-433.
- [37] Michalik L., Auwerx J., Berger J.P., Chatterjee V.K., Glass C.K., Gonzalez F.J., Grimaldi P.A., Kadowaki T., Lazar M.A., O'Rahilly S., Palmer C.N., Plutzky J., Reddy J.K., Spiegelman B.M., Staels B., Wahli W., International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharm Rev* 2006;58: 726-41.
- [38] Murphy F.R., Issa R., Zhou X., Ratnarajah S., Hideaki N., Arthur M.J.P., Benyon Ch., Iredale J.P., Inhibition of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076.
- [39] Murphy F., Waung J., Collins J., Arthur M.J., Nagase H., Mann D., Benyon R.C., Iredale J.P., N-Cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Comp Hepatol* 2004;3(Suppl 1):S8.
- [40] Neubauer K., Knittel T., Armbrust T., Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury. *Gastroenterology* 1995;108:1124-1135.
- [41] Olaso E., Friedman S.L., Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998;29:836-847.
- [42] Ornitz D.M., Itoh N., Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001;2:1-12.

- [43] Pinzani M., Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 2000;21:475-490.
- [44] Příbramská V., Husová L., Jaterní cirhóza. *Interní Med* 2007;9:486-489.
- [45] Ramadori G., Saile B., Mesenchymal cells in liver – one cell type or two? *Liver* 2002;22:283-294.
- [46] Ramadori G., Saile B., Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004;84:153-159.
- [47] Reeves H.L., Friedman S.L., Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808–d826.
- [48] Rockey D.C., Housset C.N., Friedman S.L., Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest* 1993;92:1795-1804.
- [49] Ross R.S., Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res* 2004;63:381-390.
- [50] Sato M., Suzuki S., Senoo H., Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003;28:105-112.
- [51] Senoo H., Sato M., Imai K., Hepatic stellate cells - from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix. *Kaibogaku Zasshi* 1997;72: 79–94 Převzato z Friedman 2008.
- [52] Taimr P., Patogeneze fibrózy jater. *Bulletin HPB chirurgie* [online]. 2002;10 [cit. 30-03-2009]. Dostupný z WWW: <<http://www.hpb.cz/cz/cas/02-2-3/>>.
- [53] Theret N., Musso O., L'Helgoualc'h A., Clement B., Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;150: 51-58.
- [54] Thie M., Harrach B., Schönherr E., Kresse H., Robenek H., Rauterberg J., Responsiveness of aortic smooth muscle cells to soluble growth mediators is influenced by cell-matrix contact. *Arterioscler Thromb* 1993;13:994-1004.
- [55] Thompson K., Maltby J., Fallowfield J., et al., Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606.
- [56] Toyama T., Nakamura H., Harano Y., Yamauchi N., Morita A., Kirishima T., Minami M., Itoh Y., Okanoue T., PPAR α ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:697-704.

- [57] Wells R.G., Kruglov E., Dranoff J.A., Autocrine release of TGF- β by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett* 2004;559:107-110.
- [58] Yu Ch., Wang F., Jin Ch., Huang X., Miller D.L., Basilico C., McKeehan W.L., Animal model: Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003;163:1653-1662.
- [59] Somoza M. [cit. 10-03-2009]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Ppar>>.
- [60] Real-time RT PCR (kvantitativní PCR v reálném čase) [online]. [cit. 10-03-2009]. Dostupný z WWW: <<http://lem.ocol.cz/cs/info/real-time-rt-pcr-kvantitativni-pcr-v-realnem-case>>.