

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH  
VĚD

TÉMA:

VLIV EXTRACELULÁRNÍ MATRIX NA  
EXPRESI GENŮ V JATERNÍCH  
MYOFIBROBLASTICKÝCH BUŇKÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. David Houser

2012

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

TOPIC:

EFFECT OF MATRIX EXTRACELULAR GENE  
EXPRESSION IN MYOFIBROBLASTIC LIVER  
CELLS

THESIS

Author:

Bc. David Houser

2012

# OFICIÁLNÍ ZADÁNÍ ZADÁNÍ

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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.

V Pardubicích dne 11.5.2012

Bc. David Houser

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Doc.RNDr. Jiřímu Kantovi Csc. za odborné vedení mé diplomové práce a za možnost podílet se na dané problematice. Dále bych rád poděkoval Mgr. Aleně Jiroutové PhD. za pomoc a čas, který mi věnovala zejména s metodickou a experimentální částí mé práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Mgr. Evě Peterové za dohled nad experimentální částí práce a za cenné rady důležité ke zpracování naměřených dat. Mé poděkování patří i celému týmu z Ústavu lékařské biochemie za poskytnutí příjemného pracovního prostředí.

Dále děkuji své rodině za podporu poskytnutou během mého vysokoškolského studia.

## SOUHRN

Jaterní tkáň je tvořena různými typy buněk. Jaterní hvězdčité buňky a jaterní myofibroblasty (MFB) jsou zodpovědné za tvorbu extracelulární matrix při fibrotizaci jater, která je důsledkem jejich chronického poškození. V této diplomové práci jsme sledovali expresi některých genů v jaterních myofibroblastech v závislosti na kultivačním prostředí a pod vlivem růstového faktoru FGF-1.

MFB jsme izolovali z frakce neparenchymových jaterních buněk potkanů opakovaným pasážováním. Buňky jsme kultivovali na polystyrenových Petriho miskách a v kolagenním gelu. V části pokusů jsme do kultivačního media přidávali FGF-1 s heparinem, který potencuje účinek tohoto růstového faktoru.

Z buněk jsme izolovali celkovou RNA, ze které jsme reverzní transkripcí získali komplementární DNA (cDNA). Genovou expresi jsme stanovili s použitím qRT-PCR a data statisticky zpracovali. Měřili jsme expresi genů pro kolagen typu I (Col Ia 2, osteopontin, metalloproteasy MMP-9, MMP-13 a tkáňový inhibitor metalloproteas TIMP-1.

Zjistili jsme, že kultivační prostředí do značné míry ovlivňuje myofibroblasty, což se projevuje i na genové expresi. Dále z experimentů vyplynulo, že heparin zvyšuje účinek FGF-1 na buňky, čímž zvyšuje expresi genů zejména pro metaloproteinázu 13 a osteopontin. Dále jsme zjistili, že i samotný heparin zvyšuje expresi těchto genů.

Klíčová slova: jaterní myofibroblasty, exprese genů, jaterní fibróza

## SUMMARY

Liver tissue is composed of different cell types. Hepatic stellate cells and liver myofibroblasts (MFB) are responsible for the production of extracellular matrix accompanying liver fibrosis that is a consequence of their chronic damage. The expression of several genes in MFB cultured in different conditions and influenced by the growth factor FGF-1 were studied in this diploma work.

MFB were isolated from the fraction of rat hepatic nonparenchymal cells by repeated passaging. Cells were cultured on polystyrene Petri dishes and in collagen gel. In some experiments, FGF-1 together with heparin that potentiates the effect of the growth factor were added to the cultivation medium.

Total cellular RNA was isolated and reverse-transcribed to obtain complementary DNA (cDNA). Gene expression was determined with the use of qRT-PCR and the data were statistically evaluated. We determined the expression of collagen type I (Col Ia 2), osteopontin metalloproteinases MMP-9, MMP-13 and of tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1.

We have found that the culture medium largely affects myofibroblasts, which is also reflected in gene expression. Further experiments showed that heparin increases the effect of FGF-1 on cells, thereby increasing the gene expression of particular metalloproteinases 13 and osteopontin. Furthermore, we found that heparin itself increases the expression of these genes.

Key word: hepatic myofibroblasts, gene expression, hepatic fibrosis

## Seznam použitých zkratk:

ACEI	Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor
ADAM-TS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motif
ALT	Alanine Transaminase
AST	Aspartate Aminotransferase
AT-1	Angiotenzin 1
CFTR	Cystic Fibrosis Rransmembraneconductance Regulator
DR	Death Receptors
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF	Epithelial Growth Factor
ERK/MAPK	Extracellular Signal-Regulated Kinases/Mitogen-Activated Protein Kinase
ET-1	Endothelin 1
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GGT	Gamma-Glutamyl Transpeptidase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HOE 077	Prolyl 4-hydroxylase Inhibitor
HSC	Hepatic Stellate Cells
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
IF/MFS	Interface Myofibroblasts
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin



LDL	Low Density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Monocyte Colony Stimulating Factor
MFS	Myofibroblasts
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MT-MMP	Membrane-type Matrix Metalloproteinases
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NFκB	Nuclear Factor kappa B
PAF	Placental Angiogenic Factor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PET	Positron Emission Tomography
PI-3 k	Phosphoinositide 3-kinase
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted
RAS	Renin-Angiotensin System
ROS	Reactive Oxygen Species
SMAD	Sma Mother Against Decapentaplegic
STAT-1	Signal Transducers and Activators of Transcription-1
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TRAIL                      TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

VEGF                      Vascular Endothelial Growth Factor

## OBSAH:

1. ÚVOD.....	13
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
2.1. Jaterní fibróza.....	14
2.2. Klinické hledisko jaterní fibrózy .....	14
2.3. Stavba jater.....	16
2.4. Fibrogenní buňky .....	18
2.4.1. Hvězdicové buňky .....	18
2.4.2. Zánik hvězdicových buněk.....	22
2.4.3. Myofibroblasty.....	23
2.5. Vliv kultivačních prostředí 2D/3D na myofibroblasty.....	24
2.6. Růstové faktory.....	25
2.6.1. TGF- $\beta$ .....	25
2.6.2. PDGF .....	26
2.6.3. FGF.....	27
2.6.3.1. FGF-1.....	29
2.7. Extracelulární matrix.....	30
2.7.1. Matrixové metaloproteinázy.....	33
2.8. Diagnostika jaterní fibrózy.....	36
2.9. Léčba jaterní fibrózy.....	37
2.9.1. Odstranění podnětu fibrózy.....	38
2.9.2. Redukce zánětu a imunitní odpovědi.....	38
2.9.3. Inhibice aktivace HSC.....	39
2.9.4. Potlačení projevů aktivovaných HSC.....	39
2.9.5. Stimulace apoptózy.....	40
3. METODICKÁ ČÁST.....	41
3.1. Laboratorní potkani.....	41
3.2. Perfuze jater.....	41
3.2.1. Perfúzní roztoky.....	41
3.2.2. Anestezie potkana, laparotomie a kanylace v. portae.....	41
3.3. Izolace jaterních neparenchymových buněk a kultivace myofibroblastů .....	42
3.4. Příprava média pro kultivaci buněk.....	42
3.4.1. Izolace kolagenu z ocasních šlach potkana.....	42
3.4.2. příprava kolagenního gelu.....	42

3.5. Izolace RNA, její čištění a měření koncentrace.....	43
3.5.1. Lýza buněk.....	43
3.5.2. Rozpouštění buněk na plastu.....	43
3.5.3. Fenol – chloroformová extrakce.....	43
3.5.4. Přečištění RNA na kolonách Nucleospin® RNA XS.....	43
3.5.5. Měření koncentrace.....	44
3.5.6. ....	44
3.6. Ověření čistoty RNA gelovou elektroforézou.....	44
3.6.1. Princip.....	44
3.6.2. Postup.....	44
3.7. Syntéza c DNA.....	45
3.7.1. Princip.....	45
3.7.2. Postup.....	45
3.8. Kvantitativní Real-time PCR.....	45
3.8.1. Princip.....	45
3.9. Vyhodnocení výsledků.....	49
3.10. Přístroje a chemikálie.....	49
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
4.1. Morfologie buněk.....	52
4.2. Genová exprese na plastu.....	54
4.3. Genová exprese na kolagenním gelu.....	57
5. Diskuse.....	59
6. Závěr.....	61
7. Seznam použité literatury.....	62

# 1. ÚVOD

Jaterní fibróza je dynamický proces vedoucí k nadměrnému hromadění součástí extracelulárního matrixu (ECM) v játrech. Fibróza vzniká po metabolickém, infekčním nebo toxickém poškození jater. Dochází k degradaci fyziologické matrix pomocí matrixových metaloproteináz a k její náhradě za patologickou matrix. Nejvíce zastoupenou složkou patologické matrix je kolagen I, který je syntetizován především aktivovanými jaterními hvězdicovými buňkami (HSC). Takže základním rozdílem ve struktuře ECM u fibrotických jater je výrazná převaha fibrilárních kolagenních vláken a dochází zde k poruše homeostázy ECM. Jaterní hvězdicové buňky se nacházejí v Disseho prostoru a jejich hlavní funkcí ve zdravých játrech je skladování vitamínu A.

Jaterní ECM ovšem netvoří jen nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně, ale poskytuje i mnoho signálů přítomným buňkám (hepatocytům, zánětlivým buňkám apod.) nutným k udržení polarity buňky, migraci, proliferaci a diferenciaci.

Myofibroblasty jsou buňky, které tvoří kontraktilních filamenta exprimují hladkosvalový aktin a jsou v podstatě přechodem mezi fibroblasty a buňkami hladké svaloviny. V jaterní tkáni existují celkem tři typy myofibroblastů. Jsou to portální, septální a tzv interface myofibroblasty. I myofibroblasty se podílejí do značné míry na tvorbě patologické ECM.

V práci se zabývám vlivem růstového faktoru FGF-1 (kyselého FGF, aFGF) v kombinaci s heparinem a samotného heparinu na expresi genů v jaterních myofibroblastech z jater potkanů. Dále sleduji expresi v závislosti na kultivačním prostředí. Navazuji tak na práci Mgr. Aleny Jiroutové PhD. a na diplomovou práci Mgr. Evy Peterové na téma „Vliv růstových faktorů na expresi genů v jaterních myofibroblastech.“

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Jaterní fibróza

Obecný úvod o fibróze jater

Jaterní fibróza je dynamický proces, který vede k nadměrnému hromadění součástí extracelulárního matrix (ECM) v játrech. Zmnožení vaziva způsobí zjizvení jaterní tkáně a je odpovědí organismu na přetrvávající poškození jater. Základní procesy po různých typech poškození vedoucí k fibrotizaci různých orgánů jsou si podobné. Ve fibrotických játrech je přítomno nejen větší množství extracelulární matrix, ale také její složení se mění. Základním rozdílem ve struktuře ECM u fibrotických jater je výrazná převaha fibrilárních kolagenních vláken.

Proces fibrotizace je multikomponentní. Dochází k poruše homeostázy ECM. Fibrogenní kaskády se účastní řada buněk, ve hře je mnoho chemických a biologických účastníků (cytokinů, chemokinů aj.) (Taimr a spol., 2002).

Zároveň s jaterním poškozením dostanou játra podnět k regeneraci. To vede k dalšímu narušení jaterní architektury a především cévních struktur jako jsou portální žíla a jaterní žíla, to může nakonec způsobit vznik portální hypertenze a tedy i riziko nebezpečného krvácení. (Wallace a spol., 2008)

### 2.2. Klinické hledisko jaterní fibrózy

Akutní, náhodné:

Jsou náhodné reakce na běžné terapeutické dávky nebo i předávkování např. paracetamolem, tedy otravy léky. To může vést k masivní nekróze jater, akutnímu selhání jater a smrti.

Chronické:

Chronické poškození jater souvisí s progresivní fibrózou. V dnešní době jsou nejčastějšími příčinami fibróz jater a v důsledku toho i jaterní cirhózy virové infekce a nadměrná konzumace alkoholu. V poslední době se stále častěji objevuje non-alkoholická jaterní fibróza způsobená diabetem nebo obezitou tedy nealkoholickou jaterní steatózou (NAFLD), která může v konečném důsledku dojít až do stádia cirhózy jater stejně jako u alkoholiků (Williams, 2006).

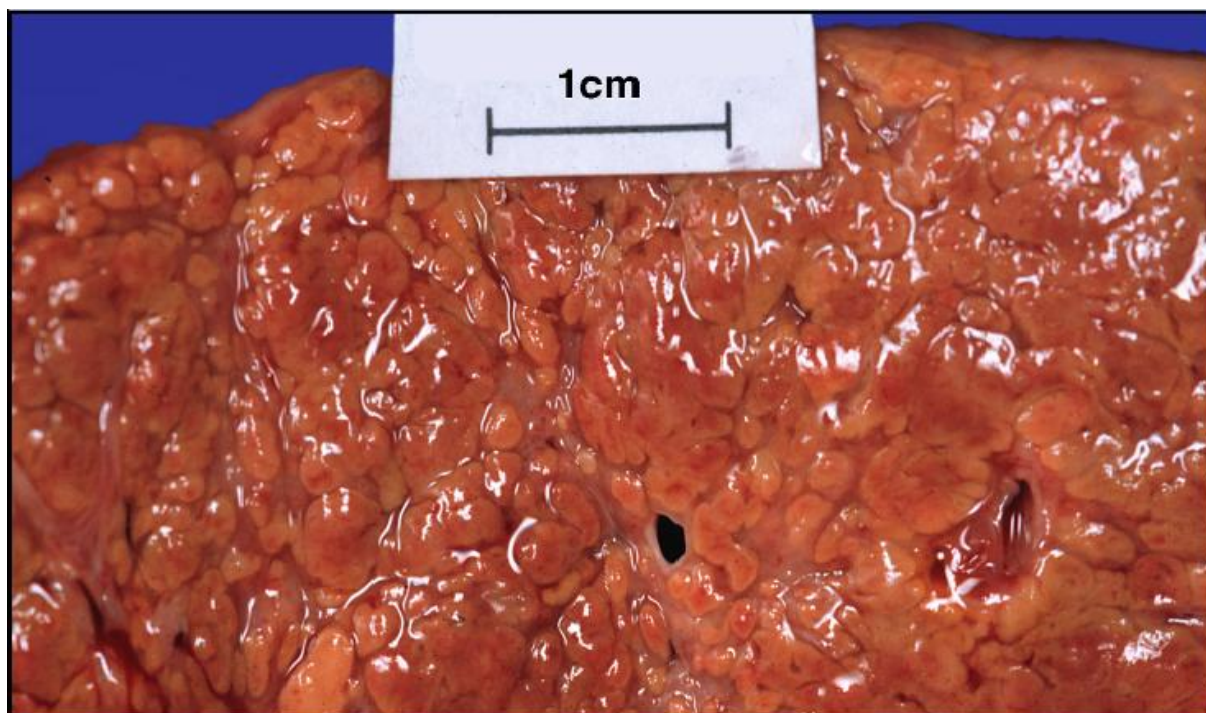
Tabulka 1:

Stručný přehled nejčastějších chronických jaterních onemocnění včetně jejich příčin, léčby a diagnostiky.

onemocnění	příčina	incidence	léčba	diagnostika
Hepatitida B	dsDNA viry (HBV),	350 mil. lidí na světě	očkování, HBV vakcína	ELISA, PCR
Hepatitida C	ss-RNA virus (HCV)	170 mil. lidí na světě	očkování neexistuje, antivirotika na bázi INF- $\gamma$ , nukleosidové analogy	ELISA, PCR
Hepatitida D	ssRNA virus (HDV)	část osob s HBV je infikována i HDV,	HBV vakcína - vhodná i pro HDV	ELISA, PCR
Autoimunitní hepatitida	nekontrolovaný útok IS na vlastní hepatocyty	mnohem častěji u žen	hlavně glukokortikoidy	postupné vyloučení jiných příčin
Wilsonova nemoc	mutace genu pro typ ATPasy transportující měď, akumulace Cu v játrech	1: 5000 až 1:30000	chelatační látky na vychytání mědi (penicilamin)	Různá kritéria, vyloučení jiných příčin
Cystická fibróza	Homozygotní mutace v CFTR	1 z 2500	Ursodeoxycholát	genotypová PCR
Alkoholismus	Zvýšení ROS, hypoxie, produkce acetaldehydu poškozujícího játra, Endotoxiny vyvolávající v játrech zánět	velmi časté, civilizační choroba. 10. nejčastější příčina smrti	abstinence !!! hepatoprotektiva, glukokortikoidy ke snížení TNF	biopsie jater, mikroskopie
Budd-Chiari syndrom	obstrukce žíly k odtoku krve z jater, často důsledek trombózy	1 z 100 000	antikoagulancia, stenty k přeměrování toku krve	

(Wallace a spol., 2008)

Obr. 2.1.: Mikronodulární cirhóza jater



zdroj: Hypertextový atlas patologie, [www.muni.cz/atlases](http://www.muni.cz/atlases), Josef Feit et al. ( publikuji s laskavým svolením autora MUDr. Josefa Feita Csc., Masarykova Univerzita, Brno)

### 2.3. Stavba jater

Makroskopická struktura:

Lidská játra leží pod bránicí na pravé straně břišní dutiny a mají zhruba klínovitý tvar. Váží asi 1 500 g, u žen bývají menší než u mužů. K bránici přiléhají hladkou brániční plochou (*facies diaphragmatica*), na které se nachází úpon srpovitého vazů (*ligamentum falciforme*). Z druhé strany na játra naléhají orgány břišní dutiny, tato plocha se nazývá *facies visceralis*. Uprostřed viscerální plochy se nachází jaterní brána (*porta hepatis*), kudy do jater vstupuje jaterní tepna a vrátnicová žíla, a kde vystupují žlučové vývodné cesty. Ve žlučníkové jámě je vrostlý žlučový měchýř. Okolní orgány a velké cévy vytvářejí na viscerální ploše jater otisky. Játra se dělí na 4 laloky. Větší pravý lalok (*lobus dexter*), menší levý lalok (*lobus sinister*), přičemž dělicí linie je tvořena průběhem srpovitého vazů (*ligamentum falciforme hepatis*), dále pak na ocasatý lalok (*lobus caudatus*) a čtyřhranný lalok (*lobus quadratus*). Toto rozdělení odpovídá krevnímu zásobení jednotlivých laloků - pravý lalok jaterní je zásoben tepennou krví z pravé větve jaterních tepen a žilní krev přitéká pravou větví vrátnicové žíly, žluč je odváděna pravým žlučovodem. U levého laloku je situace analogická.

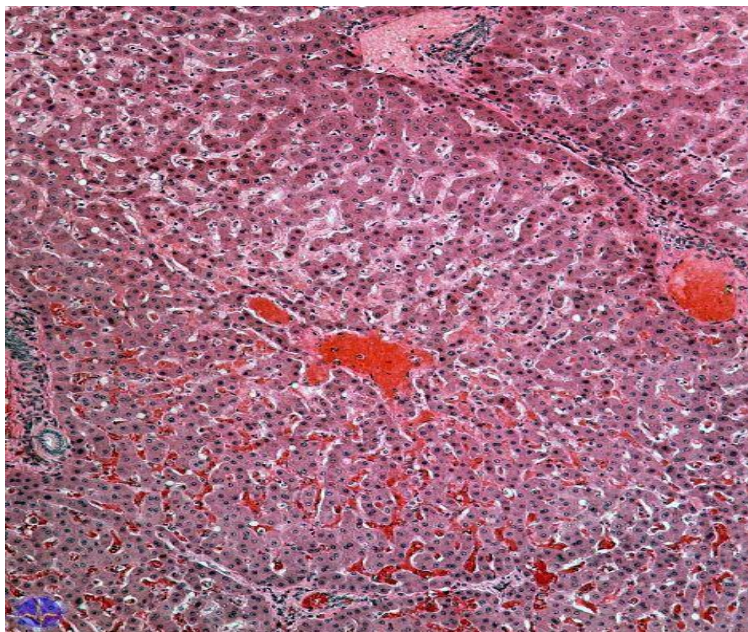
Laloky jater je možno dělit celkem do osmi segmentů. Pravý jaterní lalok je rozdělen do čtyř segmentů: V., VI., VII. a VIII. segment. Levý jaterní lalok je rozdělen také do čtyř segmentů,



rozeznává se II. a III. segment, dále segment I., který tvořen tkání ocasatého laloku (*lobus caudatus*) a segment IV. – čtyřhranný lalok (*lobus quadratus*) (Nečas E a kol., 2006).

Mikroskopická struktura:

Morfologickou jednotkou je jaterní lalůček. Rozlišuje se lalůček centrální vény a lalůček portální. Lalůčky jsou od sebe nezřetelně odděleny malým množstvím vaziva a v místech, kde se stýká několik lalůčků je interlobulární prostor neboli portobiliární prostor. V řídkém kolagenním vazivu portobiliárního prostoru probíhá interlobulární arterie, vena a žlučový kanálek. Lalůček centrální vény je složen z plochých trámců jaterních buněk – hepatocytů uspořádaných radiálně vedle sebe kolem centrální veny. Trámce jsou složeny z jedné až dvou řad hepatocytů a díky těsnému spojení vytvářejí úzký kanálek bez vlastní výstelky – tedy primární žlučovod. Na obvodu lalůčku ústí primární žlučovody do kanálek vystlaných plochým až kubickým epitelem, tzv. Herringových kanáleků, které odvádějí žluč do interlobulárních žlučovodů v portobiliárním prostoru. Mezi trámci jaterních buněk probíhají široké fenestrované kapiláry zvané jaterní sinusoidy a jsou vystlané endotelem a místy se mezi nimi vyskytují jaterní makrofágy – Kupfferovy buňky. Mezi jaterními sinusy a trámci hepatocytů se nachází úzký štěrbinovitý prostor – Disseho prostor, kde se nacházejí retikulární vlákna a Itovy buňky (hvězdicovité buňky), které obsahují velké množství lipidů a vitamínu A (Martínek a spol., 2009).



Obr. 2.2.: Jaterní lalůček je zhruba šestiúhelníkový prostor v parenchymu jater, který se periodicky opakuje a tvoří tak základní stavební jednotku jater. V jeho středu je umístěna vena centralis, kterou odtéká krev do jaterních žil. K této žíle se radiálně sbíhají trámce hepatocytů a mezi nimi uzavřené sinusoidy. Do sinusoid se krev dostává z portálních prostorů, které vytvářejí neostrou hranici mezi jednotlivými lalůčky. Tyto prostory jsou zásobeny z portální

triády, kde probíhá arteriola, venula a žlučový kanálek

zdroj: Hubičková a spol., Histopatologický atlas, str. 2, 3. Lékařská fakulta UK v Praze, (publikují s laskavým svolením spoluautorky MUDr. Lucie Hubičkové PhD, ústav embryologie a histologie, 3. LF UK Praha)

## 2.4. Fibrogenní buňky

### 2.4.1. Hvězdicové buňky

Jaterní hvězdicovité buňky (HSC), které pocházejí z mezenchymu, po své aktivaci produkují v nadbytku proteiny extracelulární matrix (ECM) a to především kolagen. HSC buňky lze kromě člověka nalézt i u prasat, myši, koček a laboratorních potkanů. Mimo játra se hvězdicové buňky vyskytují i ve slinivce břišní, v trávící trubici, v plicích a ledvinách. Na chronické či akutní poškození jaterního parenchymu reagují HSC svojí aktivací, která spočívá především v nadprodukci kolagenu typu I a III, který se ukládá do okolí buněk a způsobuje tak jeho fibrotizaci (Ehrman a spol., 2010).

Jaterní hvězdicové buňky se nacházejí v subendoteliálním prostoru mezi basolaterální stranou hepatocytů a antiluminální stranou sinusových endoteliálních buněk. Tvoří zhruba jednu třetinu neparenchymální buněčné populace a asi 15 % celkového počtu buněk v normálních játrech.

HSC mají větvenovitý tvar s oválnými nebo prodlouženými jádry. Buňky obsahují četné trny – výběžky a různé studie zjistily, že tyto výběžky slouží především ke snímání chemotaktických signálů. Těsný kontakt mezi HSC a sousedními typy buněk usnadňuje mezibuněčný přenos rozpustných mediátorů, zejména cytokinů, dále HSC přímo navazují na nervová zakončení, takže HSC se přímo účastní i neurohumorální regulace (Válek a spol., 2006)

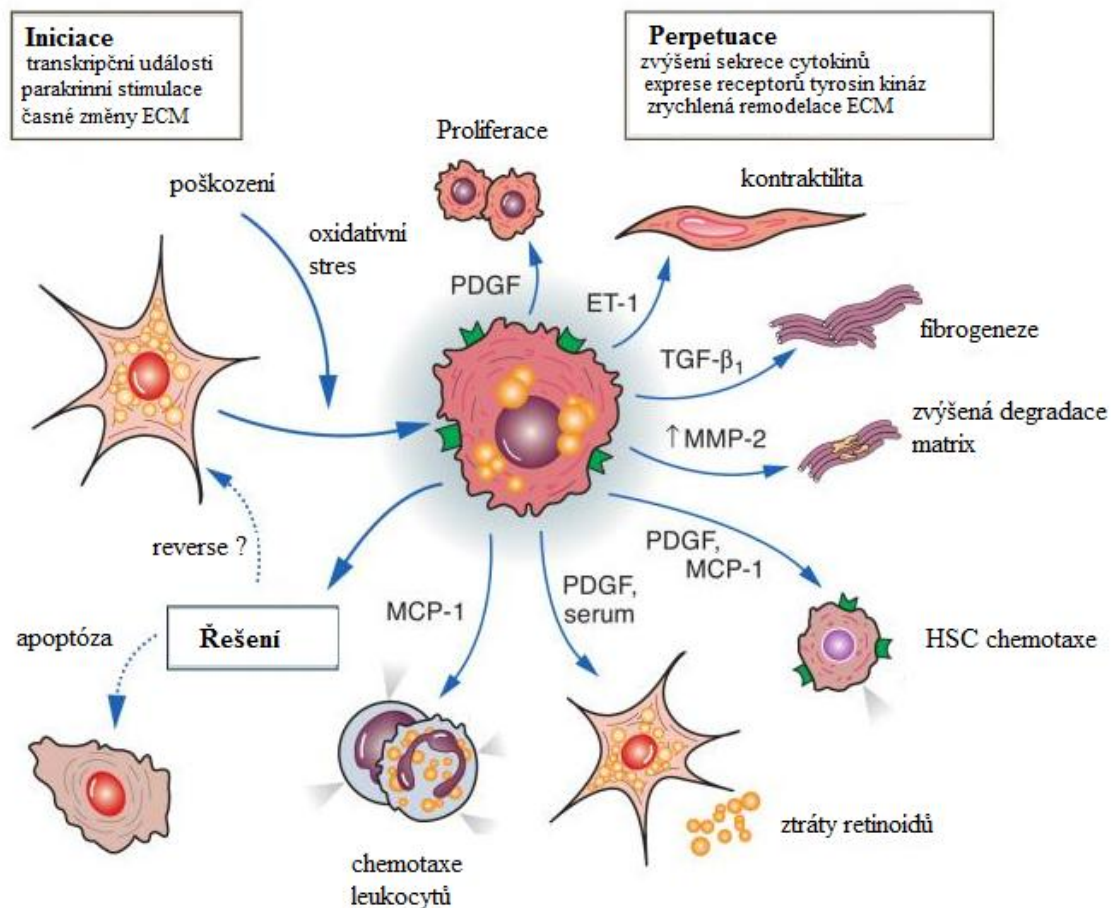
HSC se vyskytují ve dvou základních fenotypových formách. V klidovém stavu mají přibližně kulatý tvar, v jejichž cytoplazmě se ukládají tukové kapénky s rozpuštěnými estery retinolu – retinoidy. Tyto buňky v klidové formě mají velmi nízkou mitotickou, fyziologickou a proteosyntetickou aktivitu a nejsou schopny kontrakce. (Friedman, 2008)

Pro aktivovanou formu těchto buněk je typický hvězdicovitý tvar. Jejich dlouhé cytoplazmatické výběžky ovíjejí sinusoidy a vybíhají i mezi hepatocyty. Exocytózou se zbavují tukových kapének s retinoidy. Navyšuje se jejich proteosyntetická aktivita – tvorba kolagenu extracelulárně. Buňka získává schopnost stažlivosti, protože ve 100 % aktivovaných HSC je přítomen alfa aktin hladké svaloviny ( $\alpha$ -SMA) . Po aktivaci mohou HSC hrát důležitou roli v metabolismu lipoproteinů a v regulaci cholesterolu. (Nechutová, 2006)

Po své aktivaci buňky zvyšují fibroprodukcí, stávají se kontraktilními a migrují k ložisku probíhajícího zánětu, dále produkují a do svého okolí uvolňují škálu cytokinů. Některé z nich – především TGF- $\beta$  a pravděpodobně i endotelin-1 a angiotenzin-2 působí autokrinně a také parakrinně a tím stimulují a aktivují další HSC v okolí. Dochází tak k vytvoření pozitivně zpětnovazebné autokrinní smyčky, což vede k exponenciálnímu nárůstu množství aktivovaných hvězdicovitých buněk a také množství utvářeného kolagenu. (Fan a spol., 2006)

Obrázek 2.3.:

Fenotypové změny HSC při poškození jater. Mezi hlavní změny fenotypu po aktivaci patří proliferace, kontraktilita, fibrogenese, degradace normální matrix, chemotaxe a ztráta retinoidů.



Zdroj: Friedman, S.L. et al. (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-2250 (publikuji s laskavým svolením Dr. Friedmana).

### Zahájení buněné aktivity

Prvotní změny ve hvězdicových buňkách jsou pravděpodobně důsledkem parakrinní stimulace všech sousedních typů buněk – sinusových endoteliálních, Kupfferových, hepatocytů, trombocytů, leukocytů.

Endoteliální buňky se na aktivaci samotných HSC účastní tak, že produkují buněčný fibronektin a TGF- $\beta$ , tedy latentní formu tohoto faktoru transformují do aktivní profibrogenní formy.

Bylo zjištěno, že TGF- $\beta$  z Kupfferových buněk výrazně stimuluje syntézu ECM hvězdicovými buňkami. Kupfferovi buňky dále produkují protizánětlivé a prozánětlivé cytokiny IL-10 a IL-12. Cytokin IL-10 reguluje fibrogenezi v kultivovaných HSC sníženou tvorbou kolagenu a zvýšenou produkcí kolagenázy (Špičák J a kol. 2010).



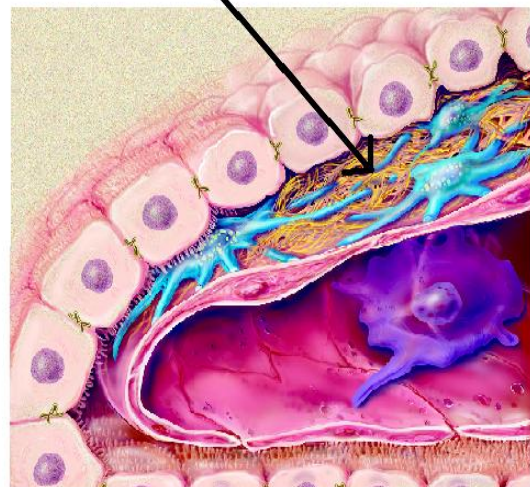
Obrázek 2.4.:

Nákres znázorňuje porovnání normálních jater a jater zasažených fibrózou s aktivovanými HSC. Normální játra: Modře znázorněná HSC v subendoteliálním prostoru mezi hepatocyty a endoteliálními buňkami. U hepatocytů jsou názorné mikrokly, u endoteliálních buněk zase četné fenestrace přispívající k rychlému transportu živin přes subendoteliální prostor. Fibrotická játra: zobrazeny aktivované HSC a okolní fibrózní matrix (žlutě), dochází ke změnám a ztrátám mikrokly hepatocytů a ztrátám endoteliální fenestrace.

Normální játra



Aktivované HSC při fibróze



(Zdroj: Friedman SL, Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications, Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 1, 98-105, (2004) – publikují s laskavým svolením Dr. Friedmana)

Aktivace HSC je tedy důsledek souhry faktorů z prostředí, vlivu ECM a okolních buněk. Aktivaci lze rozdělit dle Friedmana na 2 fáze. Jsou to fáze iniciační (preinflamatorní) a fáze udržovací. První fáze především zvyšuje citlivost na HSC k cytokinům a ta druhá vytváří nadměrné množství ECM, zahrnuje parakrinní i autokrinní stimulaci a hlavně udržuje aktivovaný genotyp HSC (Jing-Ting a spol., 2008)

Zahájení aktivace zahrnuje rychlé změny v expresi genů a fenotypu, což způsobuje, že buňky reagují na cytokiny. Perpetuační fáze aktivace HSC zahrnuje hlavně proliferaci, kontraktilitu, fibrogenezi, degradaci matrix, chemotaxi a ztrátu retinoidů (Reeves a spol., 2002)

Tabulka 2

Parakrinní faktory podílející se na aktivaci HSC a buňky, které tyto faktory produkují.

zdrojové buňky	parakrinní faktor
----------------	-------------------

hepatocyty	lipoperoxidy, TGFβ1, TGF α, IL-6, IGF-1, IGFBP
kupfferovy buňky	lipoperoxidy, TGFβ1, TGF α, IL-6, TNFα, PDGF, želatináza B
endoteliální buňky	TGFβ1, ET-1, PDGF, buněčný fibronectin
trombocyty	PDGF, TGFβ1, EGF
lymfocyty	TGFα, interleukiny
monocyty	TNFα, TGFβ1, PDGF

Tabulka 3

Spolupůsobení parakrinních a autokrinních faktorů vedoucí ke změnám pomáhajícím udržet HSC v perpetuační fázi

<b>funkční změna</b>	<b>faktor (parakrinní/autokrinní)</b>
proliferace HSC	PDGF, EGF, TGFα, bFGF, RANTES, IGF-1, CTGF, PDGF
HSC chemotaxe	PDGF, bFGF, IGF-1, M-CSF, MCP-1
leukocytární chemotaxe	M-CSF, MCP-1
fibrogenese	TGFβ1, acetaldehyd, retinoidy, IL1-β, IL-6 TNFα
kontraktilita	ET-1, PAF, oxid dusnatý, thrombin
degradace matrix	MMP-2 + MMP-9 (degradace normální matrix), snížení aktivity MMP-1 zvýšení aktivity (exprese) TIMP-1

(Svegliati-Baroni a spol, 2001)

Časné změny jsou výsledkem parakrinní stimulace HSC okolními buňkami. Hepatocyty jsou narušovány mnoha hepatotoxickými látkami, metabolity alkoholu, viry, žlučovými kyselinami atd. Poškozené hepatocyty uvolňují kyslíkové radikály a fibrogenní mediátory jako TGF-β1, TNF-α, EGF, IGF a ty indukují akumulaci leukocytů, hodně hepatocytů přitom zahyne v procesu apoptózy. Bylo prokázáno, že aktivované HSC fagocytují apoptotická tělíčka po zaniklých hepatocytech. Samotný proces fagocytózy vede k tvorbě profibrogenních cytokinů jako TGF-β1 ale i k produkci ECM, zejména kolagenu typu 1 a to jak na úrovni mRNA tak i na úrovni proteinu (Fan J et al, 2006).

### Reaktivní kyslíkové radikály (ROS)

Významným zdrojem ROS jsou Kupfferovy buňky, ale ROS mohou vnikat i v HSC, hepatocytech nebo leukocytech. Kupfferovy buňky ovlivňují HSC také tvorbou oxidu dusnatého, který působí proti ROS a inhibuje tak aktivaci HSC a omezuje jejich kontraktilitu (Pinzani a spol., 2002).

Druhá fáze aktivace HSC, udržuje buňky v aktivním stavu. Zahrnuje zejména ztráty retinoidů, přičemž význam tohoto jevu je nejasný. K vylučování dochází ve formě retinolu, ne ve formě esterů – retinoidů. Není úplně jasné, zda je ztráta retinolu důležitá pro iniciační fázi či k udržení fibrogenese

S perpetuační fází rovněž souvisí tvorba receptorů PDGF na povrchu HSC, čímž se zesílí vnímavost HSC k PDGF, což je silný mitogen. Tento receptor z receptorové rodiny tyrosinkináz se uplatňuje při přenosu mnohých cytokinových signálů jako jsou FGF, HGF, EGF, VEGF do HSC během proliferace. Intracelulární cesty po aktivaci PDGF receptoru zahrnují zejména ERK/MAP kinázu, PI-3-kinázu a STAT – 1 (Omary a spol. 2007)

Tabulka 4.

Srovnání stavu klidových a aktivovaných HSC

<b>Fenotypová forma</b>	<b>Klidová HSC</b>	<b>Aktivovaná HSC</b>
Buněčný tvar	Kulovitý	hvězdicovitý
tukové kapénky + vitamin A	bohaté intracytoplasmatické skladování	uvolňování exocytózou
kolagen 1, 3	proteosyntetická aktivita ve fyziologickém rozsahu	nadprodukce, syntéza převažuje nad degradací
mitotická, syntetická aktivita	nízká	výrazně zvýšená
přítomnost intermediárních filament	100 % vimetin, 30 % desmin, GFAP	100 % vimetin, desmin a GFAP beze změny
kontraktilita	ne, 0 % $\alpha$ -SMA	ano, 100 % HSC obsahuje $\alpha$ -SMA
membránové receptory	fyziologická povrchová exprese	navýšená exprese receptorů pro PDGF, TGF- $\beta$ , IL

(Nechutová H, 2006)

Hvězdicovité buňky jater mohou být při poškození atakovány buď přímo, tedy vlastní působící noxou nebo nepřímo, tedy metabolickými zplodinami z jiných buněčných druhů zastoupených v játrech (Bachem MG et al, 1993).

#### 2.4.2. Zánik hvězdicových buněk

Apoptóza je důležitý mechanismus ke snížení počtu aktivovaných hvězdicovitých buněk během různých fází jaterní fibrózy. Aktivované HSC jsou více citlivé na apoptotické stimuly než hvězdicovité buňky v klidovém stavu. (Taimr P et al, 2003)

Iredale a spol. ve své studii z roku 1998 uvádějí, že i u relativně pokročilého stadia jaterní fibrózy u potkanů může dojít v poměrně krátkém čase k obnovení jaterní architektury vlivem ztráty HSC buněk apoptózou. Spontánní zotavení z jaterní fibrózy je tedy důsledkem ztráty HSC obsahující  $\alpha$ -SMA. Nelze však vyloučit, že některé z buněk místo apoptózy podstoupí přechod do klidového fenotypu (Iredale a spol., 1998). Apoptóza aktivovaných HSC je nejspíš automaticky nastaveným mechanismem – tzv. default mechanism v játrech, který je ovšem během aktivní fáze poškození blokován řadou solubilních faktorů. Ale už během aktivace jsou HSC schopny na svém povrchu vytvářet tzv. death receptory (DR). Při aktivaci těchto DR receptorů dochází ke spuštění jedné z předem naprogramovaných intracelulárních cest vedoucích k apoptóze. Součástí těchto apoptotických cest jsou kaskády proteáz, konkrétně kapsáz.

Mezi nejvýznamnější smrtící receptory patří tzv. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), který se ve zvýšené míře tvoří na povrchu HSC během jejich aktivace. Tím pádem se stávají senzitivnější na vnější proapoptotickou signalizaci.

Pravděpodobně i NK-buňky jsou antifibrogenním regulátorem. Klidové HSC nereagují na proapoptotické signály poskytované NK-buňkami, ale po aktivaci se stávají vnímavějšími na tyto podněty. Za další významější DR v HSC lze považovat i Fas a NGFR (nerve growth factor receptor) (Wang a spol., 2004)

HSC, které podléhají apoptóze exprimují vysoké hladiny TIMP, takže po odstranění apoptotických buněk dochází k degradaci jizvy pomocí MMP-13. Odstranění aktivovaných HSC může tedy vést k úplnému nebo částečnému uzdravení jaterní fibrózy. (Šafka, 2011)

### 2.4.3. Myofibroblasty

Jak už bylo výše řečeno, jaterní hvězdicové buňky po aktivaci ztrácejí svou schopnost skladovat estery vitamínu A a mění se na myofibroblasty, které produkují a secernují součásti poljiva, tedy kolageny, elastin, strukturální proteoglykany a kyselinu hyaluronovou. Ke zjizvenatění jaterní tkáně menší mírou přispívají fibrocyty z kostní dřeně, portální fibroblasty a biliární epitelové buňky. Kromě mezibuněčné hmoty produkují myofibroblasty i profibrotické cytokiny a enzymy, které regulují katabolismus ECM. (Schneiderka P, 2008)

Jaterní myofibroblasty (MFS) představují heterogenní populaci buněk. Většinou obsahují hladkosvalový  $\alpha$ -aktin ( $\alpha$ -SMA), který se vyskytuje převážně ve fibrotických a cirhotických játrech. Jaterní myofibroblasty jsou velmi proliferativní a kontraktilní buňky, které aktivně přispívají k progresi chronických jaterních onemocnění. Z histopatologického hlediska v chronicky postižených játrech existují různé populace MFS, které se vzájemně liší podle antigenního profilu nebo lokalizace v játrech (Forbes a spol., 2011).

Portální myofibroblasty se nacházejí v pojivové tkáni v blízkosti portálních cév a žlučodů. Jejich přítomnost za ischemických podmínek vede k obstrukcím těchto cév a žlučodů a může vyústit až k cholestatickým onemocněním jako je biliární fibróza. (Novo E et al, 2009)

Portální MFS na svém povrchu exprimují adhezivní molekuly N-CAM a kyselý gliální fibrilární protein (GFAP) (Cassiman a spol., 2002).

Dále to jsou myofibroblasty odvozené od buněk kostní dřeně označované jako IF/MFS (interface myofibroblasty), které jsou umístěny v oblasti mezi parenchymem a stromatem portálních polí nebo sept. Dalším typem jsou septální MFS umístěné okolo vytvořených fibrotických sept (Špičák a spol., 2010).

Interface MFS jsou  $\alpha$ -SMA pozitivní buňky lokalizované na rozhraní mezi fibrotickými septy a okolní parenchym. Tyto buňky pocházejí z aktivace nebo transdiferenciace HSC nebo portálních fibroblastu. Lidské IF/MFS exprimují na svém povrch všechny typické faktory jako jsou v  $\alpha$ -SMA, GFAP, BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), ale i adhezivní molekuly N-CAM (Busletta a spol., 2003)

K rozlišení jednotlivých typů myofibroblastických buněk je možné využít základním cytoskeletární proteiny. Pro jejich klasifikaci se nejčastěji používají vimentin, desmin, GFAP a  $\alpha$ -SMA. V aktivovaných HSC a portálních myofibroblastech je obsažen  $\alpha$ -SMA, ale k produkci GFAP nedochází. HSC je možné rozlišit od portální MFS na základě rozdílné exprese fibulinu 2 a desminu. Aktivované HSC produkují desmin ale fibulin-2 nikoliv. U portálních myofibroblastů je tomu přesně naopak (Peterová, 2001).

## 2.5. Vliv kultivačních prostředí 2D/3D na HSC

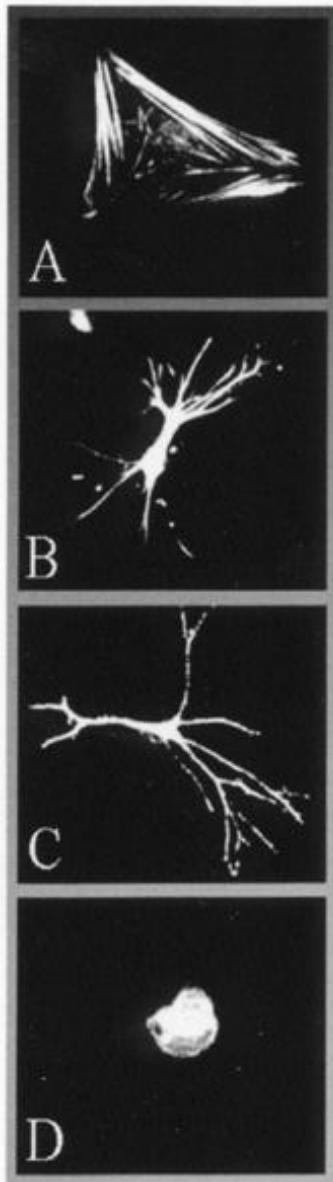
In vitro vykazují HSC kultivované v trojrozměrném (3D) gelu a na dvourozměrném (2D) plastru zásadní rozdíly, nejen ve tvaru buňky, ale i v expresi genů. U buněk kultivovaných na gelu byly prokázány interakce mezi kolagenním gelem a HSC. Dochází k nim pomocí integrinů stejně jako in vivo mezi ECM a HSC (Peterová, 2011).

V závislosti na kultivačním prostředí, na substrátu, vykazují kultivované myofibroblasty celkem 3 základní typy morfologií. Pokud jsou MFS kultivovány na povrchu polystyrenu (2D prostředí), na povrchu potaženém lysinem či aminoalkylsilanem, nebo na povrchu potaženém kolagenem typu I nebo III, mají MFS plochý polygonální tvar s dobře rozvinutými stresovými vlákny. Jsou-li MFS kultivovány na nebo v intersticiálním kolagenním gelu typu I nebo IV, vykazují buňky asteroidní tvar a mají dlouhé větvené výběžky. Zaoblený tvar lze nalézt při kultivaci na Matrigelu, což je tzv. Engelberth-Holm-Swarm extracelulární matrix (EHS-ECM) produkovaná myším sarkomem a obsahující komponenty bazální membrány (Uemura a spol. 2005, Sato a spol., 2003).

Substrát, tedy kultivační prostředí, na němž jsou HSC kultivovány dále ovlivňuje rychlost ale především stupeň aktivace HCS na myofibroblasty. Závisí zde především na tuhosti substrátu. Na substrátech se střední tuhostí buňky nejnáze přijmou stabilní střední fenotypovou formu. Pro diferenciaci buněk v závislosti na tuhosti substrátu je důležitá i jejich přilnavost k proteinům matrice a vznik mechanického napětí mezi buňkami a substrátem. Přidání růstového faktoru TGF- $\beta$  ke kultivovaným klidovým HSC nehraje zdaleka takovou roli v jejich diferenciaci na myofibroblasty jako právě mechanické vlastnosti kultivačního prostředí. Takže aktivace HSC při kultivaci je závislá spíše na fyzikálních než na chemických vlastnostech podkladu. Tato zjištění tedy naznačují, že změny v tuhosti jaterní tkáně jsou klíčovým faktorem v progresi fibrózy (Olsen a spol., 2011).

Takahara a spol. zkoumali vliv kultivačního prostředí na expresi matrixových metaloproteináz v MFS, vztah mezi ECM a HSC in vitro. Čerstvě izolované krysí HSC kultivovali na kolagenu typu I, na matrigelu a v trojrozměrném kolagenu typu I (3D gel). Výrazně zvýšená exprese genů pro MMP-3, 9, 13 a 14 byla detekována pouze u HSC kultivovaných na 3D gelu. Zároveň pomocí zymografie prokázali želatinázovou aktivitu MMP-9 vyvolanou ERK/MAPK kinázami (Takahara a spol., 2003).





Obrázek 2.5. A-D

Obrázek A ukazuje tvar HSC po kultivaci na polystyrenu, obrázek B tvar HSC po kultivaci na kolagenním gelu typu I, obrázek C tvar HSC po kultivaci v kolagenním gelu a obrázek D tvar HSC po kultivaci na matrigelu (zdroj: Sato a spol., 2004).

Potažení kultivačních misek kolagenem typu I zvyšuje proliferaci buněk a syntézu kolagenu v HSC, kdežto přítomnost kolagenu typu IV zvyšuje esterifikaci retinolu a v menší míře stimuluje produkci kolagenu. Kolagenní gel typu I stimuluje expresi MMP-13 v lidských fibroblastech. HSC v kolagenním gelu exprimují více mRNA metaloproteinás MMP-2, MMP-14 a jejich inhibitoru TIMP-2, ale méně MMP-13 než buňky na samotném polystyrenu, polystyrenu pokrytém kolagenem I nebo v matrigelu (Jiroutová, 2011).

Kolagen typu I se často volí jako 3D kultivační prostředí, protože tvoří prostředí bližší živému modelu než polystyrenová Petriho miska. Komunikace mezi myofibroblasty a ECM je zprostředkována pomocí integrinů (Peterová, 2011).

## 2.6. Růstové faktory

Fibrogenní kaskády v játrech se účastní řada buněk (viz. výše), ve hře je při tomto procesu i mnoho chemických a biologických účastníků jako jsou cytokiny, chemokiny a růstové faktory. Mezi nejvýznamější patří TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF a FGF, ale i jiné faktory jako je např. ET-1.

### 2.6.1. TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  patří mezi hlavní fibrogenní cytokiny, především TGF- $\beta$ 1 hraje ústřední roli při fibróze tím, že přispívá k přílivu buněk podílejících se na fibróze, tak k vlastní aktivitě hvězdicových buněk.

Tento faktor je produkován Kupfferovými buňkami a zvyšuje a indukuje expresi genů pro kolagen typu 1 a 2 (Stalnikowitz a spol., 2003). Transformující růstový faktor beta má celkem 3 izoformy, TGF-β1, TGF-β2 a TGF-β3, z nichž právě TGF-β1 je nejsilnější modulátor buněčné proliferace a diferenciaci. Tato izoforma se obvykle vylučuje v latentním stavu jako polypeptidový homodimer, latentní TGF-β velký 25 kD (L-TGF-β) a jeho hlavním rezervoárem je krevní sérum a také se váže na proteoglykany v ECM. Kromě Kupfferových buněk je tvořen i HSC, v menší míře pak i endoteliálními buňkami a hepatocyty. Tento faktor je přítomen jak v normálních, zdravých, tak i ve fibrotických játrech, jeho koncentrace jsou však značně zvýšené u cirhózy, tak i u experimentálně vyvolané fibrózy.

Vedle urychlení aktivace HSC a stimulace syntézy ECM vykazuje TGF-β1 i jiné mechanismy profibrogenního působení. A to zejména snížením koncentrací kolagenázy a naopak zvýšením exprese genů pro inhibitory proteáz jako jsou TIMP-1 a PAI-1, čímž vlastně chrání matrix před degradací (Reeves, 2002).

Signalizace zprostředkovaná TGF-β se kromě proliferace a diferenciaci buněk podílí i na zdárném průběhu embryogeneze, morfogeneze ale i apoptózy. Ligandy TGF-β vázané na specifické glykoproteiny ECM se působením matrixových metaloproteináz odštěpí. Tím dojde k jejich uvolnění do mikroprostředí a následné vazbě na specifické buněčné receptory. Existují 2 typy TGF-β receptorů a to TGF-βRI a TGF-βRII. Když se ligand naváže na TGF-βRII, dojde k agregaci a fosforylaci TGF-βRI, který se tak aktivuje. TGF-βRI poté fosforyluje latentní cytoplazmatické transkripční faktory z rodiny SMAD proteinů. Tyto faktory po aktivaci tvoří homodimery a heterodimery a translokují do jádra buňky, kde spouštějí expresi cílových genů.

Kromě Smad proteinů může aktivovat ligandový komplex receptorů pro TGF-β i celá řada jiných signálních drah včetně NFκB, ERK/MAPK, p38 MAPK aj. Samotný TGF-β může fungovat i jako silný tumor supresor i jako onkogen (Klener a spol., 2010).

### 2.6.2. PDGF

Z chemického hlediska se jedná o dimerní glykoprotein skládající se z 2 řetězců A nebo B (homodimerní PDGF) nebo z jejich kombinací, tedy AB (heterodimerní PDGF). Tento růstový faktor odvozený od destiček se podílí mj. na růstu buněk, na mitóze a důležitou roli sehrává při angiogenezi. Je to silný mitogen především pro buňky mezenchymálního původu, pro hladkosvalové buňky a gliové buňky.

Signalizační síť tvoří celkem 4 ligandy - PDGF A až D a dva receptory – PDGFR-α a PDGFR-β. Všechny izoformy PDGF jsou syntetizovány jako homodimery spojené disulfidickými můstky, pouze izoformy A a B jsou schopny tvořit heterodimery (Heldin CH, 1992).

Jak už bylo řečeno výše, aktivace HSC a jejich proliferace je výsledkem působení parakrinních stimulů a to především v iniciační fázi aktivace, přičemž právě PDGF je nejúčinnějším proliferačním faktorem na počátku rozvoje jaterní fibrózy. Perpetuační fáze je pak spíše spojena s vyšší expresí receptorů pro PDGF. Signalizační dráhy zde fungují tak, že aktivovaný PDGFR aktivuje signalizační molekuly, které dále aktivují signalizační dráhu ERK/MAPK. Pro mitogenezi je důležitá i aktivace fosfoinositol 3-kinázy. Pro proliferativní odpověď na PDGF je důležitý i trvalý příjem extracelulárního  $Ca^{2+}$  a zvýšení intracelulárního pH (Friedman, 2000).

PDGF se váže na několik plazmatických bílkovin a také na proteiny extracelulární matrix, což usnadňuje lokální koncentrace faktoru. PDGF funguje jako místní autokrinní a parakrinní růstový faktor. V dospělém organismu se tžaké podílí na procesech hojení ran. Aberantní exprese PDGF je pozorována i u cévních proliferativních onemocnění jako je ateroskleróza. Homodimerní PDGF-AA je na rozdíl od PDGF-AB a PDGF-BB špatným mitogenem pro cévní a jiné hladkosvalové buňky. Nicméně spolu s bFGF, který zvyšuje expresi PDGFR- $\alpha$ , působí synergicky na syntézu DNA v těchto buňkách. PDGF nekomunikuje s epiteliálními a endotelovými buňkami, protože tyto typy buněk neexprimují na svém povrchu PDGF receptory.

Bylo zjištěno, že PDGF reguluje syntézu vlastního receptoru a také ovlivňuje expresi membránových receptorů pro IL1, EGF, 5-hydroxytryptamin, LDL a transferin (Adams EF et al, 1991).

### 2.6.3. FGF

Růstových faktorů fibroblastů je celkem 23 (FGF 1 – FGF-23), představují tedy jednu z největších rodin polypeptidových růstových faktorů, které plní důležité funkce v období embryonálního vývoje a v období dospělosti. V embryonálním období FGF řídí vývoj parenchymových orgánů a podílí se i na komunikaci mezi epiteliálními a mezenchymálními buňkami.

V dospělosti jsou FGF důležité při hojení ran, u tkáňových náhrad, uplatňují se při metabolismu a napomáhají udržení homeostázy (Olsen SK, 2003). FGF mají molekulové hmotnosti od 17 do 24 kDa a mezi FGF různých druhů obratlovců existuje 13 až 71% identita v sekvencích aminokyselin. Zejména u obratlovců jsou velmi evolučně konzervované geny kódující jednotlivé FGF.

Většina FGF, konkrétně 3 až 8, 10, 15, 17 až 19 a 21 až 23 mají aminoterminální signální peptidy a díky nim jsou rychle vyličovány z buněk. U FGF 9, 16 a 20 signální peptidy chybí, přesto jsou však z buněk vylučovány. FGF 1 a 2 rovněž nemají signální sekvence a nejsou z buněk secernovány, mohou však být k dispozici na buněčném povrchu v rámci ECM (Ornitz DM et al, 2001).

Tabulka 3.  
Charakteristika proteinů rodiny FGF

Název	synonyma	signalizace přes vysokoafinitní receptory	poznámky
FGF-1	aFGF, kyselý FGF	FGFR-1 - III b a IIIc; FGFR-2 - III b a III c FGFR-3 - III b a III c; FGFR-4	bez signální sekvence, pouze 1 forma mRNA
FGF-2	bFGF, bazický FGF	FGFR-1 - III b a IIIc; FGFR-2 - IIIc; FGFR-3 - III c; FGFR-4	4 proteinové izoformy, bez signální aminokyselinové sekvence
FGF-3	Int-2	FGFR-1-III b; FGFR-2-III b	místo integrace MMTV v myším genomu
FGF - 4	kFGF, kaposi FGF	FGFR-1-III c; FGFR-2-III c; FGFR-3-III c	Identifikován při screeningu nádoru

	hst-1	FGFR-4	žaludku, vztah ke Kaposiho sarkomu má signální sekvenci
FGF-5		FGFR-1-III c; FGFR-2-III c	má signální sekvenci
FGF-6	hst-2	FGFR-1-III c; FGFR-2-III c; FGFR-4	má signální sekvenci
FGF-7	KGF	FGFR-2-III c	má signální sekvenci, specifický pro endoteliální buňky
FGF-8	AIGF	FGFR-1; FGFR-2-III c; FGFR-3-III c; FGFR-4	7 izoforem, všechny se signální sekvencí
FGF-9	GAF	FGFR-2-III c; FGFR-3-III b a III c; FGFR-4	bez signální sekvence, není angiogenní
FGF-10	KGF-2	FGFR-1-III b; FGFR-2-III b	má signální sekvenci, strukturou a funkcí podobný FGF-7
FGF-10 až 14		zatím neznámé	všechny obsahují jaderné lokalizační motivy, žádný nemá signální sekvenci
FGF-15		zatím neznámé	gen pro FGF-15 je aktivován E2A-Pbx1
FGF-16 až 19		FGFR-17; FGFR-1-III c; FGFR-2-III c	všechny mají signální sekvence
FGF-20	XFGF-20	zatím neznámé	sekvenční homologie a FGF-9

(Powers a spol., 2000)

Všechny FGF mají společné některé strukturální charakteristiky a většina z nich je schopna vázat heparin.

Mezi první objevené FGF patří FGF 1 a FGF 2 označované jako kyselý a bazický FGF. Byly izolovány z tkáně hypofýzy u skotu. U lidí je aFGF (kyselý) složen ze 155 aminokyselin. FGF 2 s molekulovou hmotností 18 kDa je s FGF 1 sekvenčně identický z 55 %. Kromě 18 kDa formy bFGF byly zjištěny 3 další formy tohoto faktoru s hmotnostmi 22.5, 23.1 a 24.2 kDa (Powers a spol., 2000).

Receptory pro FGF jsou tyrozinkinázovými receptory, které obsahují dva nebo 3 podobné imunoglobulinové domény a sekvenci pro vázání heparinu. Alternativní sestřih mRNA genu pro FGFR určuje sekvenci C-terminální poloviny imunoglobulinové domény III, takže rozlišujeme III b a III c izoformy FGFR (Ornitz a spol., 2001).

Existuje celkem 5 základních typů FGFR. Po translačním sestřihu, který se ovšem týká pouze prvních čtyř receptorů (FGFR 1 až 4) dojde k vytvoření celkem 48 různých izoforem FGFR. K interakcím s FGF dochází pomocí FGFR domén D2 a D3. Každý receptor může být aktivován různými FGF, kromě FGF-7, který aktivuje pouze III b izoformu receptoru FGFR-2 (Duchesne a spol., 2006).

Celkem nedávno byl objeven další člen receptorů FGF a to FGFR-5, byl objeven ve stromálních buňkách myších lymfatických uzlin. Byly rozlišeny celkem 2 alternativní transkripty označené jako FGFR-5  $\beta$  a  $\gamma$ , přičemž  $\beta$  obsahuje tři extracelulární imunoglobulinové domény a  $\gamma$  transkript pouze dvě. FGFR-5 postrádá na rozdíl od FGFR-1 až 4 intracelulární tyrosinkynázovou doménu (Sleeman a spol., 2001).

### 2.6.3.1. FGF-1

Jeden z nejvýznamějších zdrojů FGF-1 je mozková tkáň. aFGF je protein o molekulové hmotnosti 16 kDa s izoelektrickým bodem 5,5 až 6 o délce 140 aminokyselin. Byly však popsány i varianty aFGF o délkách 134 a 155 aminokyselin. Neobsahuje disulfidické vazby a není glykosylován. Je výsledkem posttranslační modifikace proteinu ECGF- $\beta$  (růstový faktor endoteliálních buněk).

aFGF je 16 kDa protein 140 aminokyselin (PI = 5,5-6). Varianty o délce 134 a 155 aminokyselin byly popsány také. aFGF neobsahuje disulfidické dluhopisy a není glykosylován. aFGF je odvozen posttranslační zpracování ECGF-beta (endoteliálních buněk růstový faktor).

Existuje však i zkrácená varianta aFGF generovaná odstraněním druhého exonu po alternativním sestřihu. Po sestřihu gen kóduje pouze 60 aminokyselinový aFGF s hmotností 6,7 kDa. Takto modifikovaný aFGF vyvolává pouze minimální proliferaci fibroblastů.

Existují domněnky, že zkrácená varianta aFGF působí jedinečným mechanismem pro endogenní regulaci reakcí na aFGF (Cytokines & Cell Online, k 8.3.2012).

Mnoho růstových faktorů je schopno vázat heparin resp. heparan sulfát (HS) in vitro, ovšem bylo demonstrováno, že interakce s HS/heparinem in vivo je nutná pro biologickou aktivitu aFGF. Heparin je nezbytnou součástí pro vazbu růstového faktoru aFGF na jeho receptory a tím i k jeho biologické aktivitě. Heparin vázaný na aFGF vykazuje zvýšenou stabilitu aFGF v přítomnosti kyseliny, tepla, stabilitu vůči míné oxidaci a proteolýze (Taylor, 2012).

aFGF má tyrosinkinázovou aktivitu právě skrze asociaci s heparansulfátem (HSPG), který se nachází na povrchu téměř všech buněčných typů včetně endotelia, kde se vyskytuje v podobě membránově asociovaného receptoru a dále je součástí ECM nebo může být jako volná molekula. Heparin se nachází během zánětu v krvi a váže se na aFGF s poměrně nízkou afinitou (Strain a spol., 2000)

Heparan sulfát je lineární polysacharid nacházející se ve všech živočišných tkáních a extracelulární matrix. Častěji se však vyskytuje ve formě heparan sulfát proteoglykanů (HSPG). HSPG vzniká spojením dvou nebo tří řetězců heparan sulfátu v těsné blízkosti povrchu buňky nebo proteinů ECM (Gallagher a spol., 2000). Je členem glykosaminoglykanové rodiny sacharidů a velmi úzce souvisí se strukturou heparinu. Oba se skládají z různých opakujících se disacharidových podjednotek obsahující sulfát. Nejčastější disacharidová podjednotka HS se skládá z glukuronové kyseliny spojené s *N-acetyl-D-glukosaminem* a obvykle tvoří přibližně 50% celkových disacharidovými podjednotek (Gallagher a spol. 1985).

HSPG jsou tedy složené z proteinového jádra, které je kovalentně připojeno ke glykosaminoglykanovým řetězcům. Bílkovinná část určuje lokalizaci proteoglykanu na povrchu buněk nebo v ECM, glykosaminoglykanová část zprostředkovává interakce s ligandy ECM. Pomocí těchto interakcí mohou HSPG ovlivňovat buněčnou adhezi, migraci, proliferaci

a diferenciaci. HSPG se chovají jako koreceptory růstových faktorů a podílejí se tak na mnoha vývojových a patologických procesech včetně hojení ran apod. Mezi nejvýznamější HSPG patří syndekany a glypikany (Woods a spol., 2000).

Všechny FGF molekuly mají vysokou afinitu k heparan sulfátu. Četné studie dokazují, že heparan sulfát ve formě HSPG hraje přímou roli na tvorbě účinných FGF/FGFR signalizačních komplexů. Až do roku 1999 neexistoval žádný přímý důkaz o tom, že HSPG jsou nutné pro biologickou aktivitu faktorů FGF in vivo. Studie od Lin a spol. z roku 1999 však dokázala, že heparan sulfát je nezbytný pro funkci FGF během vývoje *Drosophila melanogaster* (Ornitz a spol., 2000).

Vazba na volný heparin či HSPG snižuje titr FGF, kterého se pak nedostává k aktivaci FGFR. Naopak s buňkou asociované heparin a HSPG jsou nezbytné pro správnou vazbu FGF na FGFR, vyvolávají internalizaci FGF a mohou sami spouštět signální odpověď. Jejich množství se v endotelu zvětšuje působením hypoxie. HSPG nacházející v ECM pak zvyšují lokální koncentraci a navozují dlouhodobou stimulaci ECM (Bučinská, 2009)

## **2.7. Extracelulární matrix**

Jaterní extracelulární matrix je komplikovanou strukturou makromolekul, která podléhá remodelaci během růstu a poškození jater. Jaterní ECM tvoří nejen nosné pletivo, které mechanicky udržuje strukturu tkáně, ale poskytuje také mnoho signálů přítomným buňkám (hepatocytům, zánětlivým buňkám apod.) nutným k udržení polarity buňky, migraci, proliferaci a diferenciaci. Většina molekul ECM vytváří signály, které jsou pomocí specifických buněčných receptorů, především integrinů, převáděny intracelulárně a ovlivňují transkripci genů. Řada růstových faktorů se váže na ECM a uvolňuje se v případě poškození tkáně, čímž dále zesiluje hojící se (fibrotizační) pochody. Matrix také vytváří cesty pro migraci buněk. Normální i patologický ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty. Hlavním nesolubilním fibrózním proteinem v tkáních je kolagen (Taimr, 2002). ECM ve zdravých játrech zahrnuje kolageny, nekolagenní glykoproteiny, růstové faktory, glykosaminoglykany, proteoglykany aj. V normálních játrech je především kolagen typu I a III a XI. Tyto kolageny jsou převážně v pouzdrech, v oblasti kolem velkých cév. V pokročilém stadiu fibrózy se obsah kolagenu 3 zvyšuje až desetinásobně (Schuppan a spol., 2001).

Vývoj fibrózy jater s sebou nese významné změny v množství i kvalitě jaterní ECM a existují přesvědčivé důkazy o tom, že HSC buňky jsou ve fibrotických játrech jeho hlavními producenty. Při chronickém poškození jater se aktivují HSC a z nich vznikající  $\alpha$ -SMA pozitivní myofibroblasty produkující širokou škálu kolagenních i nekolagenních bílkovin. Fibrotická játra obsahují asi šestkrát vyšší množství ECM než játra zdravá. V Disseho prostoru se hromadí především kolageny III a V a fibronektin na počátku akutního jaterního poškození. Při hojících procesech ve fibrotických játrech je důležitá přestavba ECM, což znamená synéza a degradace ECM, přičemž degradace převládá a dochází tedy k úbytku ECM. Tyto děje mají za následek obnovu normální jaterní architektury (Benyon a spol., 2000).

Existuje celkem 19 typů kolagenu a asi 80 až 90 % celkového kolagenu je tvořeno typy I až III. V játrech bylo doposud potvrzeno celkem 10 typů kolagenu (I, III, IV, V, VI, VIII, XIV,

XV, XVIII a XIX). Tyto kolageny můžeme rozdělit do 3 skupin. Fibrilární kolageny, s fibrilami spojené (fibril-associated) a blanotvorné (sheer-forming). Typickým fibrilárním kolagenem je kolagen I. Strukturální jednotka kolagenu I se skládá ze tří vláknitých podjednotek -  $[a1(I)]_2[a2(I)]$ , které vytvářejí typickou trojšroubovici (triple helix). Mezi další fibrilární kolageny řadíme kolagen II, III, a V. Mezi fibrilární kolageny jsou navázány krátké kolageny druhé skupiny (např. VI a IX), které pomáhají udržovat komplexní strukturu vláken. Všechny kolageny jsou tvořeny sekvencí aminokyselin Gly-Pro-X (Li a spol., 2001).

Normální i fibrózní jaterní ECM je tvořena třemi základními složkami a to kolageny, glykoproteiny a proteoglykany. Z kolagenů to jsou zejména kolageny I, III, V a XI. Mezi glykoproteiny můžeme řadit fibronectin, laminin, merosin a tenascin, mezi proteoglykany pak patří heparan, dermatan, chondroitin sulfáty, perlecan a jiné. Množství a rozložení těchto makromolekul je velmi variabilní a závisí hlavně na věku a stavu jater. U normálních jater jsou v subendoteliálním prostoru a na bazálních membránách non-fibrilární, kolagenní proteiny – především typy IV, VI a VIX, dále glykoproteiny a proteoglykany. Tato tzv. subendoteliální ECM je u zdravých jater důležitá zejména pro zachování funkcí rezidentních jaterních buněk včetně hepatocytů a HSC.

Dále můžeme v játrech rozlišit tzv. intersticiální ECM, které se většinou vyskytuje ve formě pouzder lokalizovaných v oblasti cév a portální žíly. Skládá se z fibrilárních proteinů a to zejména z kolagenů typu I a III, beněčného fibronectinu a dalších glykokonjugátů. Při procesu fibrózy dochází k významným změnám v jaterní ECM a to jak kvantitativním tak i ke kvalitativním. Celkový obsah kolagenních i nekolagenních složek se při fibróze zvyšuje třikrát až osmkrát. Dále dochází ke změnám v typu ECM, množství subendoteliální ECM se snižuje a naopak přibývá intersticiální ECM bohatou právě na fibrilární komponenty. Tento proces lze označit jako „kapilarizaci“, což vede k úbytku hepatocytů a k odstranění fenestrace endotelu (Li a spol., 1999).

Fibrogenní kolageny, tedy I, III a V jsou nejhodnějšími proteiny v jaterní ECM. Jsou důležité z hlediska mechaniky jater, přispívají k pevnosti jater v tahu. Tyto kolageny netvoří samostatné struktury, jsou spíše zabudovány do kompozitních vláken a relativní zastoupení jednotlivých kolagenů tohoto typu určuje mechanické vlastnosti daných vláken i jejich odolnost k proteázám. Kolagen I má několik přerušení, která umožňují vytvoření pevné trojšroubovicové struktury (Wells, 2005).

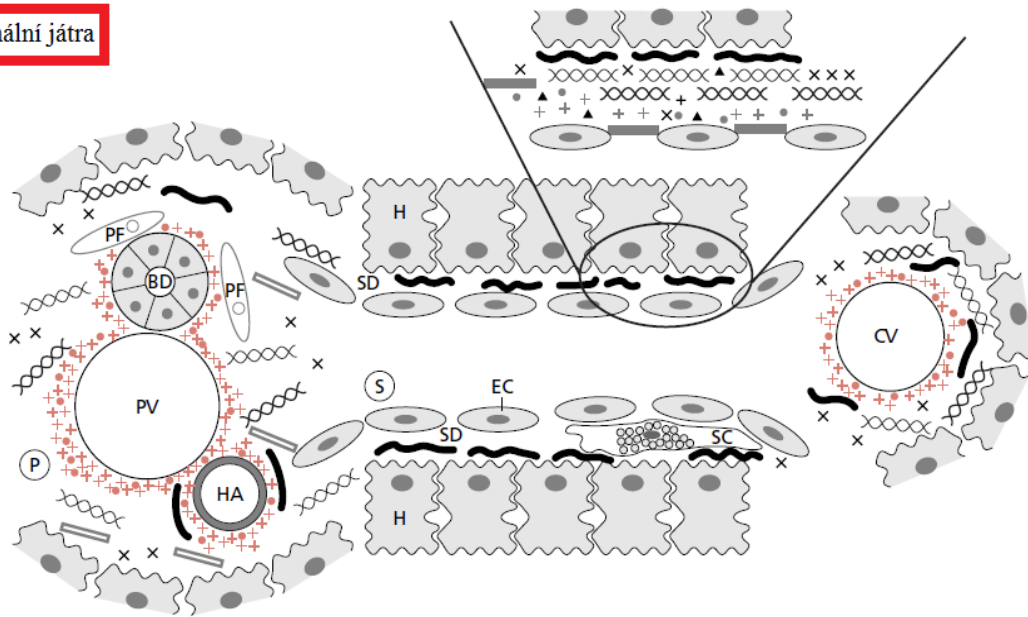
Na postranních řetězcích dochází k interakcím mezi šroubovicemi resp. mezi lyziny nebo hydroxylyziny jednotlivých šroubovic a vzniká tak aldolový cross-link, který stabilizuje šroubovice. Reakci katalyzuje extracelulární enzym lyzyl oxidáza (Harvey a spol., 2000)

Obrázek 2.5.: Rozdělení hlavních složek ECM v normálních a fibrózních játrech.

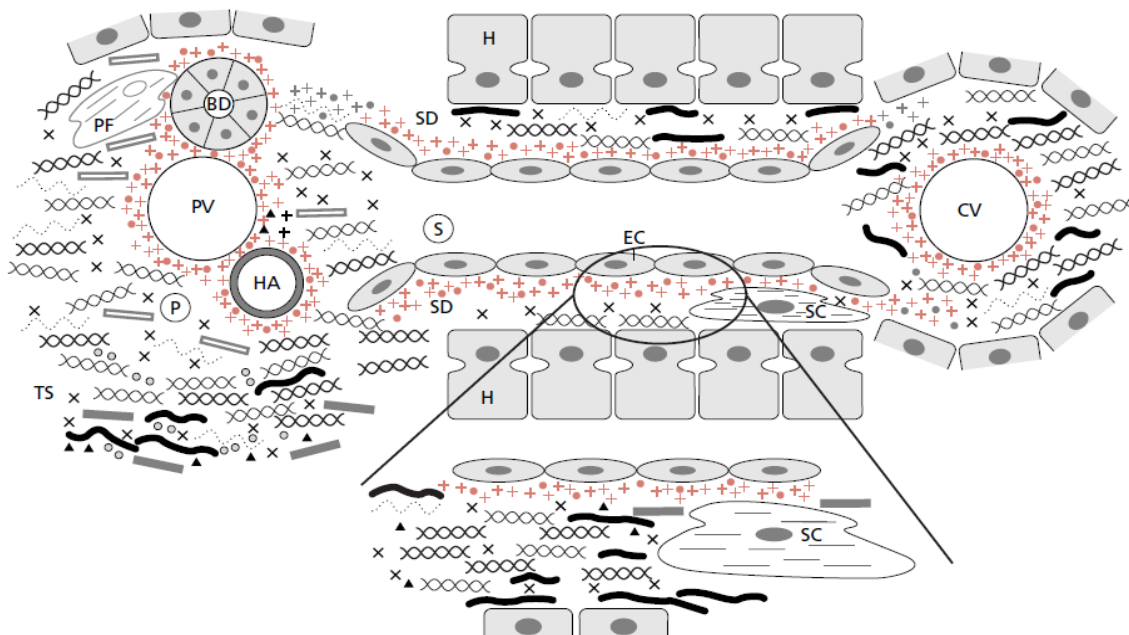
Vzájemný vztah mezi různými složkami ECM není zatím kompletně znám a je zobrazen jen schematicky.

PV = portální žíly, HA = jaterní tepna, SC = jaterní hvězdčité buňky, ES = sinusové endoteliální buňky, PF = portální fibroblasty, SD = Disseho prostor, BD = žlučovod, H = hepatocyty, TS = septa, S = sinusoidy, P = portální trakt

### Normální játra



### Fibrotická játra



Kolagen I Kolagen III Kolagen V	} Kompozitní vlákna	+ Laminin + Kolagen IV • Perlecan	× Kolagen VI + + + + Bazální membrána
---------------------------------------	---------------------	---	--

Fibronektin Kolagen XIV Tenascin - C	Fibrilin Elastin spojený s kolagenem VIII
--	--



Zdroj: Wells RG, Function and metabolism of collagen and other extracellular matrix proteins, FUNCTIONS OF THE LIVER, str. 264 (publikuji s laskavým svolením Dr. Wellsové)

### 2.7.1. Matrixové metaloproteinázy

Pokud je možná regenerace jater, tedy pokud je jaterní fibróza vratným procesem, musí existovat enzymy, které štěpí nadbytečné kolagenní struktury a podílejí se tak na odstranění nebo minimalizaci fibrózy. Tyto enzymy se označují jako matrixové metaloproteinázy.

Rodina enzymů metaloproteináz, dále zahrnuje skupiny astacinů, disintegrin metaloproteináz (ADAM) a disintegrin metaloproteináz trombospodinovou částí (ADAM-TS). Jak již bylo řečeno, MMP jsou enzymy obsahující ve své struktuře  $Zn^{2+}$ . Existuje více než 20 MMP u lidí a jsou objeveny další. Matrix metaloproteinázy, někdy také nazývané matrixiny, vykazují společné vlastnosti mezi které patří již zmiňovaná přítomnost  $Zn^{2+}$  v aktivním místě, dále schopnost štěpit alespoň jeden protein extracelulární matrix, syntéza v inaktivní podobě ve formě zymogenu, inaktivní podobě se na  $Zn^{2+}$  váže cysteinová oblast a dalším společným znakem MMP je, že jejich regulace probíhá pomocí tkáňových inhibitorů TIMPs (tissue inhibitors metaloproteinases) (Hasman, 2001).

Všechny matrixiny jsou syntetizovány jako prepro-enzymy a vylučovány jako neaktivní pro-MMP (Hideaki N a spol., 1999). Matrixové metaloproteinázy jsou kolektivně schopné odbourávat v podstatě všechny složky ECM a mají i další funkce zejména v remodelaci tkání ve fyziologických situacích při migraci buněk, při tkáňových náhradách, angiogenezi a embryogenezi. Je pravděpodobné, že různé skupiny MMP, které mají různé substrátové specifity, spolupracují buď paralelně nebo kaskádovitě pro dosažení účinné a cílené degradace ECM.

MMP lze rozdělit do 5 skupin podle jejich substrátové specifity:

#### 1. Kolagenázy:

- |                             |          |
|-----------------------------|----------|
| a) Fibroblastová kolagenáza | (MMP-1)  |
| b) Neutrofilní kolagenáza   | (MMP-8)  |
| c) Kolagenáza – 3           | (MMP-13) |

#### 2. Stromelysiny:

- |                    |          |
|--------------------|----------|
| a) Stromelysin – 1 | (MMP-3)  |
| b) Stromelysin – 2 | (MMP-10) |
| c) Stromelysin – 3 | (MMP-11) |
| d) Metaloelastáza  | (MMP-12) |
| e) Matrilysin      | (MMP-7)  |

### 3. Želatinázy:

- a) Želatináza – A (MMP-2)
- b) Želatináza – B (MMP-9)

### 4. Metaloproteinázy membránového typu:

- a) MT1-MMP (MMP-14)
- b) MT2-MMP (MMP-15)
- c) MT3-MMP (MMP-16)
- d) MT4-MMP (MMP-17)
- e) MT5-MMP (MMP-24)
- f) MT6-MMP (MMP-25)

### 5. Další MMP:

- a) MMP-12 (metaloelastáza)
- b) MMP-19
- c) MMP-20 (enamelysin)
- d) MMP-21 (X-MMP)
- e) MMP-23 (CA-MMP)
- f) MMP-27 (C-MMP)
- g) MMP-28 (epilysin)

(Kähäri a spol., 1997)

Struktura MMP je charakterizovaná signálním peptidem, propeptidem, katalytickou doménou obsahující vazebné místo pro zinek, dále hemopexinovou doménu (hemopexin-like domain), která chybí u matrilysinu. Želatinázy navíc mají jako součást katalytické domény fibronektin typu II a MMP membránového typu mají ještě transmembránovou doménu na C-terminálním konci (Knäuper a spol., 1996).

### Kolagenázy:

MMP-1 má štěpí především intersticiální kolageny, tedy kolageny typu I, II, III, VII, X a v aktivní formě má molekulovou hmotnost 42 kDa (Woessner, 1991).

MMP-1 vzniká ve formě proenzymu, který může být aktivován na svou biologicky aktivní formu plazminem (Santala a spol., 1999). Dále může být MMP-1 aktivován serinovými proteázami jako jsou plazmatický kalikrein, trypsin, kathepsin G, tryptázy a chymázy, ale i MMP-10 může aktivovat MMP-1 (Saunders a spol., 2005).

Další ze skupiny kolagenáz MMP-8 přednostně štěpí kolagen typu 1 (Marini a spol., 2000), ale má i další substráty, např. kolagen typu II a III. MMP-8 je aktivován plasminem MMP-3 a 10 (Kähäri a spol., 1997).

K produkci MMP-8 dochází také v bronchiálních epiteliálních buňkách, u neutrofilů, monocytů a makrofágů infiltrujících bronchiální epiteliální oblast, takže u bronchitidy a dalších plicních onemocnění může MMP-8 hrát roli při destrukci tkáně průdušek a plic (Prikk a spol., 2001).

Další z kolagenáz MMP-13 je glykosylovaný protein o hmotnosti 60 kDa (Knäuper a spol., 1996), který štěpí nejvíce kolagen typu II, dále pak kolageny I, III, IV, IX, X, XI, želatinu, laminin aj. MMP-13 je aktivován plasminem, MMP-2, MMP-3 a MMP-10. (Kähäri a spol., 1997).

#### Stromelysiny:

Druhou skupinou matrixových metaloproteináz jsou stromelysiny. MMP-3, 7, 10 a 12 jsou vytvářeny jako proenzymy, které ke své aktivaci potřebují proteolytické stěpení (Saunders a spol.,(2005), Moilanen a spol.,(2003)). MMP-3 a 7 štěpí kolagen IV, aggrecan a nidogen, MMP-10 a 11 navíc ještě elastin. MMP-3 je aktivován plasminem, kalikreinem a chymázami, MMP-7 tryptázou, elastázou a kathepsinem G, MMP-10 fibrinem a MMP-12 plasminem a MMP-3 (Kähäri a spol., 1996).

Karboxylová, tedy C-terminální hemopexinová doména metaloproteinázy MMP-3 nemá žádnou známou funkci a lze ji odstranit bez ztráty enzymatické aktivity( Wilhelm a spol., 1992). Osteopontin rovněž slouží jako substrát pro MMP-3.

MMP-7 je konstrukčně odlišný od ostatních matrix metaloproteináz, tím, že mu chybí C-terminální hemopexinová doména a obsahuje atypický šestý exon (Gaire a spol., 1994).

Enzymy této skupiny jsou syntetizovány především fibroblasty, monocyty a makrofágy. MMP-10 je tvořen i v endoteliálních buňkách a HSC (Peterová, 2011), ale např. MMP-10 je produkován i osteoblasty chondrocyty většinou mononukleárních buněk kostní dřeně. (Bord a spol., 1998).

#### Želatinázy:

Třetí skupina matrixových metaloproteináz zahrnuje MMP-2 a 9. Želatináza-A (MMP-2) má molekulovou hmotnost 72 kDa, štěpí želatinu, kolagen typu IV, fibronectin a tenascin. Může být aktivována MMP-1, MMP-7, MT 1-MMP a MMP-13. Želatináza-B (MMP-9) štěpí želatinu, kolageny typu IV a XIV a  $\alpha$ -2 makroglobulin. Aktivována může být Plasminem MMP-3 a želatinázou-B. Obě želatinázy jsou secernovány především endoteliálními buňkami ale i monocyty (Kähäri a spol., 1997).

Hemopexinová doména MMP-2 je důležité pro interakci s inhibitory jako je TIMP-2 a TIMP-4 (Bigg a spol., 1999). Nedávno bylo zjištěno, že na aktivaci MMP-2 se podílí i trombin a že heparan sulfát je nezbytný pro tuto trombin zprostředkovanou aktivaci (Koo a spol., 2010).

Želatináza-B se často nachází a uplatňuje v místech aktivní přestavby tkání a neovaskularizace. Exprese MMP-9 je vysoká zejména v období embryonálního vývoje, dále pak v místech zánětu a u různých patologických procesů jako artritida, nádory. Mimo jiné i MMP-9 je zodpovědná za invazivní chování trofoblastů a metastatických nádorových buněk (Thiennu, 1998).

#### Metaloproteinázy membránového typu:

MMP-14 má širokou substrátovou specifitu zahrnující kolagen typu I, II, III, dále želatina, elastin, tenascin a nidogen,( Sato a spol., 1994) dále iniciuje aktivaci některých rozpustných MMP, reguluje funkce buněčných receptorů a jejich signalizaci. MMP-14 je syntetizována

jako latentní zymogen a k aktivaci je nutné N-terminální proteolytické štěpení (Remacle a spol., 2005)

Všechny MT-MMP mají transmembránovou doménu a krátkou C-terminální oblast přes kterou může ovlivňovat intracelulární proteiny, které regulují buněčnou funkci nebo lokalizaci. U MT-4 a 6 MMP chybí MT- smyčky na transmembránové doméně a jejich cytoplazmatické C-terminální konce jsou vázány k buněčné membráně GPI kotvou, což znamená, že tyto 2 enzymy představují funkčně odlišnou větev enzymatické rodiny MMP (Lambert a spol., 2004). Hepatocyty například exprimují MMP-15, endoteliální buňky MMP-16 a monocyty MMP-17 (Peterová, 2011).

Tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP):

Existují různé mechanismy, které inhibují nebo regulují činnost MMP. K inhibici může např. dojít různými interakcemi se  $Zn^{2+}$  na aktivním místě enzymu, rozštěpením aktivní části enzymu nebo vazbou molekuly na enzym, čímž vznikne jeho neaktivní forma. MMP je možné regulovat i na úrovni transkripce.

Proteolytická aktivita MMP zapojených do degradace ECM musí být rovněž přesně řízena jejich inhibitory – TIMP. (Brew a spol., 2000)

Tkáňové inhibitory metaloproteináz jsou přírodní inhibitory MMP, které se vyskytují ve většině tkání a tělních tekutin. Inhibicí aktivit jednotlivých MMP se podílejí na tkáňové remodelaci extracelulární matrix. Rovnováha mezi činnostmi MMP a TIMP se podílí na normálních i patologických událostech (Evrosimovska a spol., 2011).

Zatím byly popsány celkem 4 tkáňové inhibitory označené jako TIMP-1, 2, 3 a 4. Jsou to látky o molekulové hmotnosti 21 až 30 kDa, které jsou buď vylučované nebo povrchové ve spojení s MT-MMP. TIMPs mají mimo jiné i vliv na růst buněk a na jejich přežití. Jako první z těchto inhibitorů byl v roce 1985 identifikován TIMP-1, který stimuloval růst některých buněčných linií. Také se zjistilo, že tento inhibiční protein produkují kultivované fibroblaty. TIMP-1 inhibuje MMP-1, 3 a 9 lépe než TIMP-2. TIMP-2 také potencuje aktivitu a stimuluje růst lymfoidních buněk. TIMP-2 je produkován lidskými keratinocyty v oblastech poranění (Brew K et al, 2000). TIMP-2 má na MMP-2 dvojí účinek – k aktivaci proMMP-2, která je zprostředkována MT-MMP, je vyžadována i přítomnost menšího množství TIMP-2, ale větší koncentrace MMP-2 naopak inhibují a to asi desetkrát efektivněji než TIMP-1 (Arthur a spol., 2002).

Vysoké koncentrace TIMP-3 podporují apoptózu mnoha buněčných typů in vivo ale i in vitro a dochází k tomu různými interakcemi TIMP-3 a apoptotickými receptory na povrchu buněk. TIMP-3 dále inhibuje MMP-2 a MMP-9, zatímco TIMP-4 nemá specifitu k určitým metaloproteinázám a inhibuje je všechny (Evrosimovska a spol., 2011)

## 2.8. Diagnostika jaterní fibrózy

Existují celkem nedávné důkazy o tom, že i pokročilé stádium jaterní fibrózy je reverzibilní (Friedman, 2004). Při léčbě jaterní fibrózy je hlavní najít optimální způsob diagnostiky. Základem diagnostiky je jaterní biopsie, ale její značnou nevýhodou je fakt, že je náchylná k výběrové chybě. Moderním kvantitativním diagnostickým postupem se v poslední době stalo měření fibrogenní mRNA pomocí RT-PCR, kde lze sledovat změny v expresi genů ve

fibrotických buňkách. Zde můžeme usuzovat na rozvíjející se fibrózu ještě dříve, než ji prokáže biopsie.

Další možnosti jak diagnostikovat jaterní fibrózu jsou zobrazovací techniky jako CT, MRI, PET, pomocí kterých lze hodnotit intrahepatální architekturu, texturu jater, krevní tok, ale i měřit počet aktivovaných HSC pomocí buněčně specifického indikátoru, který se váže na receptory HSC. Tyto zobrazovací techniky jsou nejspolehlivější u pacientů s malou nebo žádnou fibrózou nebo naopak s velmi pokročilým stádiem fibrózy. Méně spolehlivé jsou u různých mezifází fibrózy ať už při progresi nebo při procesu hojení

V současné době se k diagnostice začínají využívat i tzv. markery jaterní fibrózy a to zejména z důvodu, že se jedná o neinvazivní ukazatele jaterní fibrózy. Existují dva zásadně odlišné přístupy vedoucí k rozdělení markerů na dvě třídy.

Markery I. třídy jsou přímé sérové markery reflektující obrat mezibuněčné hmoty anebo fibrogenní změny jaterních buněk. Jsou to vesměs nákladné jednotlivé laboratorní testy založené na metabolismu v játrech během fibrogenese.

Tyto markery mají ovšem omezené klinické využití. Patří sem např. N-terminální propeptid prokolagenu III (PIIINP). Není ale specifický jen pro játra, jeho vyšší hodnoty lze zaznamenat také u plicní fibrózy, akromegalii, pankreatitidě nebo revmatoidních chorobách. Ovšem ani další látky jako glykoproteiny (undulin, tenascin), anabolické a katabolické enzymy kolagenů jako prolylhydroxyláza a matrixové metaloproteinázy se neosvědčily jako příliš přesvědčivé markery jaterní fibrózy. Jako nejlepší marker I. třídy se zdá být kyselina hyaluronová, která u studií cirhózy způsobené nealkoholovou steatózou vykazovala citlivost 86 – 100 % se specificitou 88 %.

Markery II. třídy jsou kompilátem nepřímých sérových markerů, kterými se hodnotí všeobecné funkční změny, spíše než metabolismus mezibuněčné hmoty anebo fibrogenní přeměny buňky. Jde o víceméně levné rutinní laboratorní (jaterní) testy nebo jejich panely.

Tyto markery byly vybrány tak, aby za použití různých statistických modelů a matematických algoritmů poskytovaly co nejlepší nástroj pro detekci a grading fibrózy. Bylo navrženo mnoho různých kombinací parametrů jako jsou poměry aktivit enzymů, koagulační testy atd. Často se bere v úvahu pokles počtu trombocytů, způsobený u cirhotiků sekvestrací trombocytů do zvětšené sleziny a sníženou syntézou trombopoietinu v metabolicky insuficientních játrech.

Nejčastěji používanými algoritmy jsou fibrotest a actitest, oba založené na haptoglobulinu, alfa-2-makroglobulinu apolipoproteinu A1, GGT, bilirubinu a v případě actitestu ještě ALT. Častými jsou dále tzv. Wai-skóre (AST, ALP, trombocyty), ELF-test (TIMP-1, PIIINP, kyselina hyaluronová) a hepaskóre (bilirubin, GGT, kyselina hyaluronová, alfa-2-makroglobulin, věk a pohlaví) (Schneiderka, 2008).

## 2.9. Léčba jaterní fibrózy

Základem antifibrózní terapie je odstranění původce fibrózy a v současné době je to nejefektivnější způsob, jak léčit pacienta s jaterní fibrózou. Tento přístup je účinný zejména při chronické hepatitidě typu B nebo C, při poškození jater v důsledku konzumace alkoholu

nebo užívání drog či vlivem přetížení jater železem nebo mědí. Většina z těchto látek může vyvolat poškození jater a některé z nich, zejména alkohol a feritin mohou přímo aktivovat HSC. Na základě současného chápání buněčných a molekulárních poznatků o jaterní fibróze, lze léčbu rozdělit celkem do několika kroků. Za prvé je to odstranění fibrózního, poté redukce zánětu a imunitní odpovědi a použití přípravků k inhibici aktivace HSC resp. stimulovat apoptózu HSC a potlačení projevů již aktivovaných HSC (Razzaque, 2005).

Podle Friedmana je rozvíjející se terapie jaterní fibrózy následující:

1. Redukce primárního onemocnění
2. Inhibice aktivace HSC
3. Inhibice dějů způsobených již aktivovanými HSC – proliferace, kontraktilita.....
4. Stimulace apoptózy HSC
5. Degradace matrix

(Friedman, 2010)

### **2.9.1. Odstranění podnětu fibrózy**

Odstranění fibrózního podnětu znamená odstranit příčinu, fibrózy. Takže např. u alkoholiků je to trvalá a naprostá abstinence, léčba virové infekce u hepatitid, odstranění přebytečného železa u hemochromatózy atd. (Peterová, 2011)

### **2.9.2. Redukce zánětu a imunitní odpovědi**

Při omezení zánětu a jeho mechanismů, lze pozorovat snížení aktivace HSC. Pro léčbu zánětu jsou asi nejpoužívanější kortikoidy, které se využívají k protizánětlivé léčbě již několik desetiletí. Léčí se jimi např. autoimunitní hepatitida, akutní alkoholová hepatitida apod. Ovšem kortikoidy nemají přímý antifibrotický účinek na HSC. Při redukci zánětu je možné použít i antagonisty TNF- $\alpha$ , ale jejich antifibrotický efekt na játra zatím nebyl zaznamenán (Špičák a spol. 2010).

TNF-asociované imunitní poškození mohou omezit antagonisté RGD sekvencí, což je sekvence Arg-Gly-Asp a funguje adhezivní ligand pro ECM U primární biliární fibrózy lze k léčbě použít kyselinu ursodeoxycholovou, u níž byla prokázána protizánětlivá aktivita. Podobný účinek jako tato kyselina má i její derivát označovaný jako NCX-1000, jenž uvolňuje oxid dusnatý, čímž redukuje zánět. U pacientů s chronickým onemocněním jater je velmi aktivní renin-angiotenzinový systém (RAS). Vzhledem k tomu, že angiotenzin II (AT-II) stimuluje kontraktilitu a proliferaci HSC a zvyšuje expresi prozánětlivého TGF- $\beta$ , se mnohé klinické studie zaměřily na možné použití inhibitoru angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE-i) a blokátoru AT-I. Zjistilo se, že ACE-i výrazně snižuje jaterní fibrózu. Další studie také prokazují, že užití ACE-i v kombinaci s jinými látkami jako jsou interferony, mesylát a vitamin K, vykazuje velmi silné inhibiční účinky na rozvoj jaterní fibrózy a proliferaci HSC (Yoshiji a spol., 2007)

Za další protizánětlivý a možná i antifibrózní lék je považován kolchicin. Existuje několik randomizovaných klinických studií, které měly posoudit, zda má kolchicin nějaké účinky u

pacientů s nealkoholickou i alkoholickou fibrózou jater a měly posoudit vliv tohoto přípravku na úmrtnost pacientů (Rambaldi a spol., 2001)

Dr. Kersenobitch a jeho tým už v r. 1979 provedli dvojitou studii, které se účastnilo celkem 43 pacientů, z nichž 20 dostalo placebo a 23 1 mg kolchicinu po dobu 5 dní v týdnu po dobu experimentu. K úmrtí v souvislosti s jaterní fibrózou došlo u 4 pacientů na kolchicinu a u 8 na placebo. Pravděpodobnost přežití u kolchicinu byla tedy větší než u placebo, ale rozdíl nedosáhl statisticky významné úrovně. U 3 přeživších na kolchicinu došlo k ústupu fibrózy, což prokázala biopsie jater, u dalších šesti pacientů na kolchicinu došlo ke zlepšení jaterních testů, zmizel ascites a zmenšila se slezina. Přeživší pacienti na placebo vykazovali spíše zhoršení fibrózy a to zejména pokles sérové koncentrace albuminu u pacientů s cirhózou (Kersenobitch a spol., 1979)

Protizánětlivý a imunosupresivní účinek má i interleukin 10, který byl klinicky vyzkoušen u pacientů s hepatitidou C, přičemž snížil dle očekávání zánětlivou aktivitu a možná měl i antifibrotický účinek. (Špičák a spol., 2010)

### **2.9.3. Inhibice aktivace HSC**

Dalším z léčebných postupů je omezení přeměny HSC na myofibroblasty. Vzhledem k tomu, že výrazným stimulem aktivace HSC je oxidační stres, uplatňují se zde zejména antioxidanty, které v experimentálních studiích snižovaly fibrogenezi a to zejména vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol). Herbální léky a substance, jako je např. Silymarin, se při léčbě fibrózy využívají už dlouho. Silymarin je rostlinný výtažek z rostliny ostropestřec mariánský se tradičně využívá k léčbě hepatopatií. Jedná se o směs tří bioflavonoidů – silybinu, silydianinu s silychristinu. Při studiích na tkáňových kulturách zpomalil rozvoj jaterní fibrózy (Špičák a spol., 2010).

Silymarin má metabolické a buněčné regulační účinky reguluje propustnost buněčných membrán, inhibuje 5-lipoxygenázu a odstraňuje reaktivní kyslíkové radikály (Saller a spol., 2001)

Velmi účinná při fibróze je také látka označená jako XCHT nebo japonsky Sho-saiko-to, je bylinná substance získaná celkem ze sedmi různých rostlin a je součástí japonské a čínské herbální medicíny. Ovlivňuje aktivity TNF- $\alpha$ , metaloproteináz, interferonů, snižuje oxidační stres a ovlivňuje NK-buňky.

Při experimentech na tkáňových kulturách příznivě ovlivňoval aktivaci i kontraktilitu HSC S-adenosylmethionin, u kterého bohužel dodnes nebyly zjištěny antifibrotické účinky.

U polyenylfosfatidylcholinu jsou předpokládány ochranné účinky na buněčné membrány. Po podání u alkoholické hepatitidy dochází ke snížení fibrózy (Špičák a spol., 2010).

### **2.9.4. Potlačení projevů aktivovaných HSC**

Toto potlačení spočívá v tom, že určité molekuly dokáží blokovat tyrosinkinázové receptory různých profibrogenních cytokinů a tím omezit jejich aktivitu. Jedná se třeba o antagonisty TGF- $\beta$ , které dokáží inhibovat aktivitu tohoto silného mitogenu, čímž snižují produkci patologické ECM, ale také se podílejí na degradaci této ECM. Dále se jedná o látky, které blokují expresi genů pro kolagen nebo přímo syntézu kolagenu (zejména kolagen I). Jedná se zejména o halofuginon (Špičák a kol., 2010).

K potlačení projevů aktivovaných HSC byly dále navrženy látky jako HOE 077 nebo Safironil, které fungují jako inhibitory prolyl-4-hydroxylázy a blokují tak syntézu kolagenu. Studie těchto dvou látek byla provedena u jater poškozených  $CCl_4$ . Výhoda těchto látek spočívá v tom, že na rozdíl od ostatních antifibrogenních látek neničí kolagen i v jiných tkáních jako je kůže, kosti a cévy, ale jsou zaměřeny výhradně na játra. Jsou totiž syntetizovány jako neaktivní proformy s amidovanými karboxylovými skupinami a k jejich aktivaci je nutná oxidativní deaminace, ke které dochází pomocí cytochromu P-450. Koncentrace P-450 je v játrech výrazně vyšší než v jiných tkáních, takže lze předpokládat, že HOE 077 a Safironil budou specifické pro játra, resp. odbourávání jaterního kolagenu (Yuan a spol., 1998)

### 2.9.5. Stimulace apoptózy HSC

Stimulovat apoptózu je možné např. fungálním toxinem – gliotoxinem. Jedna studie se zaměřila na účinky této látky u kryš, u nichž byla fibróza vyvolána pomocí thioacetamidu. Výsledky prokázaly, že gliotoxin opravdu způsobuje apoptózu HSC in vivo, což znamenalo výrazné zlepšení fibrózy (Dekel a spol., 2003)

Antagonisté  $\alpha$  i  $\beta$  integrinu snižují proliferaci HSC a rovněž indukují jejich apoptózu.

Vzhledem k tomu, že v jaterním parenchymu je selektivní distribuce řady proapoptotických receptorů, bylo by teoreticky možná je využít k selektivní stimulaci a tím ke spuštění apoptózy pouze HSC. Takže např. nějaký selektivní agonista TRAIL-R2/DR5, třeba monoklonální protilátka TRA-8, může indukovat apoptózu HSC, aniž by došlo k apoptóze okolních hepatocytů. Jedná se zatím ovšem pouze o terapeutický koncept.

Regulátorem fibrózy jater jsou také NK-buňky, u nichž se v experimentu podařilo prokázat jejich schopnost indukovat apoptózu aktivovaných HSC pomocí tvorby TRAIL ligandu, přičemž následně opravdu poklesla fibrotizace jater (Špičák a spol., 2010).



## 3. METODICKÁ ČÁST

### 3.1. Laboratorní potkani

Projekt práce byl schválen odbornou komisí pro ochranu laboratorních zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF HK). Veškeré práce s laboratorními zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK. Pro pokusy byli použiti samci potkanů kmene Sprague-Dawley (Anlab-Praha), o hmotnosti 350–450 g. Potkani byli chováni v místnostech se stálou teplotou 22°C a potrava jim byla podávána *ad libitum*.

### 3.2. Perfuze jater

#### 3.2.1. Perfuzní roztoky

Při perfuzi jater byly použity následující roztoky:

Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku HBSS(-) (200ml)  
Roztok proteázy v Hanksově roztoku HBSS(+)(2mg/ml; 100 ml)  
Roztok kolagenázy v HBSS(+)(0,1mg/ml; 250 ml).  
Roztok 0,5M sodné soli HEPES

Pomocí roztoku 0,5M sodné soli HEPES bylo pH roztoků upraveno na 7,35. Teplota roztoků byla 37°C a průtok roztoků během perfuze byl nastaven na 10ml/min. Perfuze se ukončila v okamžiku, když z konzistence jater bylo patrné, že struktura jaterních laloků byla rozrušena. Teplota jater byla během celé perfuze udržována na 37°C pomocí lampy se 100 W žárovkou. Teplota se měřila digitálním teploměrem vsunutým pod játra.

#### 3.2.2. Anestezie potkana, laparotomie a kanylace v. portae

K anestezii byl použit pentobarbital (Nembutal) i. p. v dávce 50mg/kg. Zvíře bylo upoutáno k podložce v poloze na zádech, oprační plocha na břicho byla oholena a dezinfikována 70% ethanolem.

Kůže i břišní se nůžkami rozstříhli do tvaru písmena V. Střih začal ve střední čáře nad symfýzou a byl veden laterálně na obě strany. U žeber zvířete byl střih ukončen, aby nedošlo k pneumothoraxu. Volná kůže a svalovinu se překlopily na hrudník zvířete. Játra se očistila od všech ligand. Odklopením jaterních laloků kranálně byla zpřístupněna vena portae, která byla očištěna od tuku a vaziva. Pod v. portae se vytvořily tři ligatury, jedna co nejbližší ke střevu, druhá a třetí asi 1 cm od jaterního hilu. Do v. saphena zvířete byl aplikován heparin (2 500 U). Místo se po aplikaci krátce stlačilo. Podvaz nejbližší střev byl zcela zatžen. Do v. portae se zavedla heparizovaná flexila, která byla upevněna dvěma podvazy. Na flexilu se nasadila proplachovací hadička a započala perfuze. V. cava inferior byla přestřižena. Játra byla promyta přibližně 100 ml HBSS(-) a poté byla perfundována roztokem pronázy a nakonec roztokem kolagenázy. Po ukončení perfuze bylo vazivo odstřiženo a játra vyjmuta.

### **3.3. Izolace jaterních neparenchymových buněk a kultivace myofibroblastů**

Jaterní pouzdro se v laminárním boxu rozstříhlo a buněčná suspenze se přenesla do lahve s 0,001% roztokem DNázy. Směs se inkubovala ve vodní lázni při 37°C za nepřetržitého třepání po dobu 30 min. Směs se přefiltrovala přes sterilní polyamidovou tkaninu (velikost pórů 67  $\mu\text{m}$ ) do 50 ml centrifugačních zkumavek. Přefiltrovaná suspenze buněk ve zkumavkách byla doplněna HBSS (+) a centrifugovala se 7 minut při 400g a teplotě 4°C. Po centrifugaci byl odsát supernatant a buňky se resuspendovaly v HBSS(+). Poté se směs opět centrifugovala 7 minut při 400g a teplotě 4°C. Po odsání supernatantu byl přidán roztok HBSS(+) a komerční 60% Optiprep do konečné koncentrace 17 %. Suspenze se promíchala a přenesla do 15 ml zkumavek a převrstvila se 11.5% Optiprepe, 2 ml HBSS(+). Dále se směs centrifugovala 17 minut při 1 400g a teplotě 20°C. Bělorůžová vrstva buněk vytvořená na rozhraní vodné fáze a Optiprepu se odsála, promyla HBSS(+) a centrifugovala při 450g, čímž došlo k odstranění posledních zbytků Optiprepu. Poté se odsál supernatant a buňky byly rozmíchány v kultivačním médiu s přidavkem fetálního telecího séra (FBS; konečná koncentrace 10%) a o L-glutaminu (konečná koncentrace 4 mM). Médium bylo obohaceno o antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Konečný počet buněk byl stanoven počítáním v Bürkerově komůrce. Mrtvé buňky byly obarveny 0,2% trypanovou modří.

Buňky byly kultivovány na Petriho miskách o ploše 60  $\text{cm}^2$  v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a při vlhkosti 85 %. Buňky se jedenkrát týdně pasážovaly a to celkem čtyřikrát. Medium se měnilo po 2 až 3 dnech. Po čtvrté pasáži se buňky přenesly na 0,1% kolagenní gel na Petriho miskách s plochou 8  $\text{cm}^2$  v počtu 300 tisíc. Další den se buňky přelily tenkou vrstvou stejného gelu. Část buněk byla kultivována na plastu v Petriho miskách s plochou 60  $\text{cm}^2$  v počtu 800 tisíc. 24 hodin před přidáním růstových faktorů se snížila koncentrace FBS. U buněk kultivovaných na plastu se médium vyměnilo za medium s 0,5% FBS. U buněk kultivovaných na gelu se koncentrace FBS snížila opakovanou výměnou média. Po přidání růstového faktoru se buňky kultivovaly v termostatu v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a při vlhkosti 85 % po dobu 12 hodin.

### **3.4. Příprava média pro kultivaci buněk**

#### **3.4.1. Izolace kolagenu z ocasních šlach potkana**

K získání kolagenu jsme se použily ocasní šlachy mladého potkana o hmotnosti 180-200 g. Preparace probíhala ve fyziologickém roztoku, aby se zabránilo jejich vyschnutí. Po nastříhání na menší kousky se ocasní šlachy zvažily a ponechaly přes noc ve sterilním fyziologickém roztoku při teplotě 4°C. Poté se suspenze přefiltrovala a opětovně suspendovala v 0,25M kyselině octové. Kolagen v suspenzi se za stálého míchání rozpouštěl po dobu 48 hodin při 4°C. Dále byl extrakt podroben dialýze proti roztoku 0,02M kyseliny octové a centrifugoval se po dobu 40 minut při 9 000 otáčkách za minutu. Koncentrace kolagenu byla stanovena vážkově.

Po naředění na koncentraci 1,33 mg/ml se roztok kolagenu steriloval filtrací přes filtr o velikosti pórů 0,45 $\mu\text{m}$  a zamrazili při -70°C.

#### **3.4.2. Příprava kolagenního gelu**

Byla vytvořena směs roztoku kolagenu v 0,02M kyselině octové a čtyřikrát koncentrovaném roztoku DMEM v poměru 3:1. Výsledná koncentrace kolagenu byla 0,1 %. Na Petriho misky o ploše 8 cm<sup>2</sup> se napipetovalo po 2 ml směsi. Po polymerizaci, která trvala 1 – 2 hodiny, se gel přelil stejným množstvím DMEM média s 20% FBS. Další den se na gel aplikovala suspenze jaterních buněk, které byly přelity 0,4 ml roztoku kolagenu a DMEM. Kultivace probíhala 4–5 dní, kdy médium bylo měněno zprvu denně a pak po 2 dnech.

### **3.5. Izolace RNA, její čištění a měření koncentrace**

#### **3.5.1. Lýza buněk**

Lýza buňky je prvním krokem izolace nukleových kyselin. Buněčnou membránu lze rozpoustit detergentem, v molekulární biologii se jako detergent zpravidla používá guanidinthiocyanát (GTC). Postup a použité chemické látky se liší u buněk pasážovaných na gelu a na plastu.

#### **3.5.2. Rozpouštění buněk na gelu**

Při rozpouštění buněk na gelu se nejprve gel dvakrát opláchne vychlazeným PBS. Pomocí sterilní špachtličky se gel přenesení do zkumavky Corex chlazené v ledu. Zkumavka se centrifuguje 5 minut při 16 000 g ve 4°C. Supernatant se odstraní sterilní pipetou. Do zkumavky se přidá nasycený GTC (+) a směs se vortexuje. Po dokonalém rozpuštění gelu se směs přelije do sterilních zkumavek.

#### **3.5.3. Rozpouštění buněk na plastu**

Při rozpouštění buněk na plastu se buňky rovněž dvakrát opláchly PBS a následně jednou pufrem TS. Buňky se seškrabou z Petriho misky buněčnou škrabkou a malým množstvím TS pufru. Buňky se přenesou do 50 ml zkumavky chlazené v ledu a celý postup se dvakrát opakuje. Směs se centrifugovala 5 minut při 3 500 g ve 4°C. Po odstranění supernatantu se přidá standardní GTC (+) a směs se převede do sterilních zkumavek.

#### **3.5.4. Fenol – chloroformová extrakce**

K vlastní izolaci RNA se využívá různých metod. Při této práci byla použita fenol – chloroformová metoda. Principem metody je extrakce.

K buněčnému lyzátu je přidána směs fenolu syceného vodou a chloroformu. Třepáním dochází k mísení fází a vysrážení proteinů. Po ustálení rozhraní fází se nukleové kyseliny nacházejí ve vodné fázi a vysrážené proteiny tvoří bílý prstenec mezi fázemi. K lyzátu se přidá 10% objemu 2M octanu sodného o pH 4,0 a směs se opatrně promíchá. Do směsi se přidá 100% původního objemu fenolu nasyceného vodou. Po promíchání se přidá 20% původního objemu chloroformu. Roztok se 10 sekund vortexuje a následně 15 minut inkubuje v ledu. Po centrifugaci, která probíhala 15 minut při 14 000 ot/min ve 4°C, se opatrně odsaje horní vodná vrstvu. Vodná vrstva se přenesení do čisté zkumavky a centrifuguje 15 minut při 14 000 ot/min ve 4°C. Poté se odsaje supernatant, ke kterému se přidá 10% původního objemu 3M octanu

sodného pH 5 a 100% objemu ledového 2-propanolu. Směs se přenesení na 24 hodin do -70°C. Po rozmražení se směs centrifuguje 20 minut při 14 000 g ve 4°C. Supernatant se opatrně odstraní a vysrážená RNA se třikrát promyje vychlazeným 75% ethanolem. Ethanol se odpaří se odsaje, RNA se nechá oschnout na vzduchu a rozpustí ve vodě prosté RNAs.

### 3.5.5. Přečištění RNA na kolonách Nucleospin® RNA XS

Mechanismem je kombinace selektivních vazebných vlastností membrány na bázi silikagelu a mikrospínové technologie. Díky speciálním pufrům dochází k vysolování RNA. RNA delší než 200 bází se naváže na membránu, menší úseky RNA projdou kolonou a jsou selektivně vyloučeny. Při přečišťování RNA na kolonách Nucleospin® RNA XS bylo postupováno podle návodu dodaného výrobcem.

### 3.5.6. Měření koncentrace

Pro zjištění koncentrace RNA se na spektrofotometru proměřila směs 0,5 µl suspenze RNA ve 200 µl 10 mM TRIS pH 7,5. Měření probíhalo při vlnových délkách 260 a 280 nm proti slepému vzorku (vodě prosté Rnas). Experimentálně se zjistilo, že je-li absorbance při 260 nm rovna 1, je koncentrace roztoku 40 mg/ml. Úpravou vznikl vzorec na výpočet celkové koncentrace:

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

## 3.6. Ověření čistoty RNA gelovou elektroforézou

### 3.6.1. Princip

Ke kontrole čistoty RNA se nejčastěji používá gelová elektroforéza. Principem je odlišné chování molekul v elektrickém poli. K separaci dojde díky rozdílu v náboji molekuly a její molekulové hmotnosti. Gel je tvořený agarózou a tvoří poměrně hustou síť, kde se větší molekuly zadržují déle a menší molekuly procházejí rychleji. Tento jev se označuje jako molekulově síťový efekt. Nukleové kyseliny nesou v zásaditém prostředí záporný náboj a putují ke kladně nabitým elektrodám – anodám.

### 3.6.2. Postup

Před elektroforézou byla stanovena koncentrace RNA ve vzorku. K elektroforéze se použilo 0,5 µg RNA. K roztoku RNA se přidalo stejné množství denaturačního pufru. Po desetiminutové inkubaci při 65°C se přidalo 1 µl ethidium bromidu, který slouží jako interkalační činidlo.

Gel byl připraven z agarózy a 10x borátového pufru. 360 mg agarózy se rozpustilo ve 30 ml borátového pufru. Suspenze se zahřívala v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza úplně nerozpustila. Poté se přidalo 2 ml 36% formaldehydu, který zde funguje jako inhibitor RNaz a směs se nalila na elektroforetickou desku, kam se ještě před ztuhnutím nasadil hřebínek k vytvoření jamek. Po ztuhnutí gelu se opatrně vytáhl hřebínek a do jamek se napipetovaly vzorky. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 40 V.

## 3.7. Syntéza cDNA

### 3.7.1. Princip

RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, proto se izolovaná RNA nejprve převádí na komplementární DNA (cDNA). Tuto reakci katalyzuje reverzní transkriptasa. Amplifikaci RNA zahajuje dvojice tzv. „random primerů“ (náhodných primerů), které se naváží na základě komplementarity na RNA. Do reakční směsi jsou kromě této dvojice ještě přidány volné deoxynukleotid trifosfáty (dNTP), ze kterých je pomocí reverzní transkriptasy vytvořen komplementární řetězec DNA mezi primery.

### 3.7.2. Postup

Připraví se 10 µl vzorku s obsahem RNA 1 µg. Ke vzorku je přidáno 10 µl premixu podle tabulky. Roztok je umístěn do termocykleru, kde byl inkubován podle teplotního programu: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min.

Tabulka : Premix pro syntézu cDNA – vztaženo na jednu reakci

	1 reakce (µl)
10 x RT pufr	2,0
25 x dNTP směs	0,8
10 x random primery	2,0
Multiscribe RT (50 UI/µl)	1,0
voda prostá Rnaz	4,2
celkem	10,0

## 3.8. Kvantitativní Real-time RCR

### 3.8.1. Princip

Metoda kvantitativní real-time PCR (*qPCR*) je moderní technika molekulární biologie, která umožňuje rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí spočívá v opakované replikaci úseku DNA ohraničeného specifickými primery pomocí termostabilní DNA polymerázy (zpravidla *Taq* polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) procesem teplotního cyklování. V každém cyklu dochází v ideálním případě ke zdvojení amplifikované sekvence, jejíž množství tak exponenciálně roste.

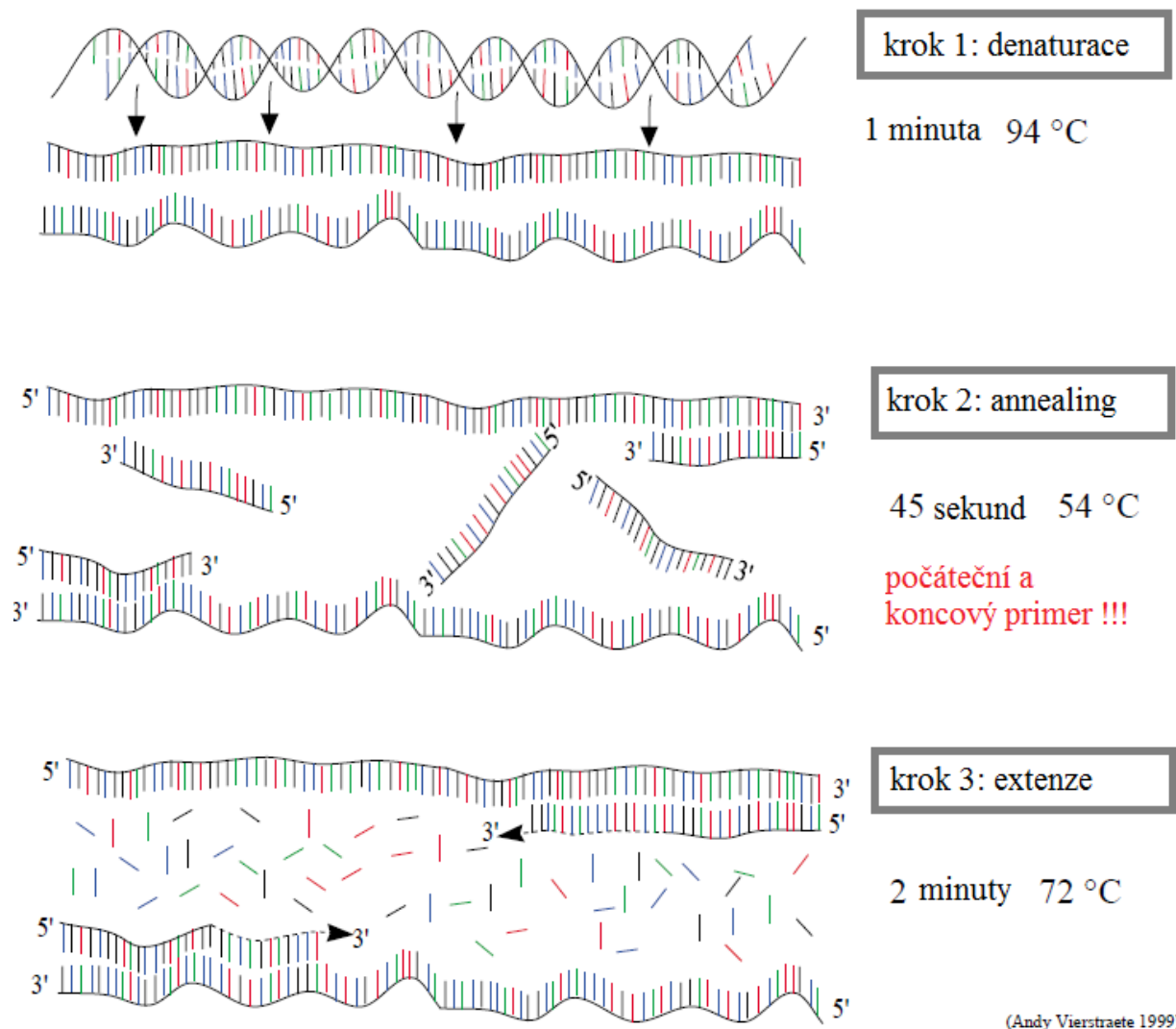
Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace. Real-time PCR se provádí s pomocí

přístrojů zvaných **cyclery**, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

(zdroj: Generi Biotech)

Před vlastní řetězovou reakcí musí být provedena počáteční denaturace, během které dojde ke kompletnímu rozpojení řetězců DNA. Obvykle postačuje zahřátí směsi na 95°C po dobu 2 – 5 minut. Prvním krokem PCR je denaturační krok, který trvá jen po dobu 20 – 45 sekund. V druhém kroku probíhá připojení dvojic primerů (annealing). Teplotu určují typy použitých primerů. Sekvence a koncentrace primerů významně ovlivňuje výsledek PCR. Během třetího kroku dochází k polymerázové reakci, při níž DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec DNA, které slouží jako templát pro další cykly. PCR probíhá v 25 – 35 cyklech.

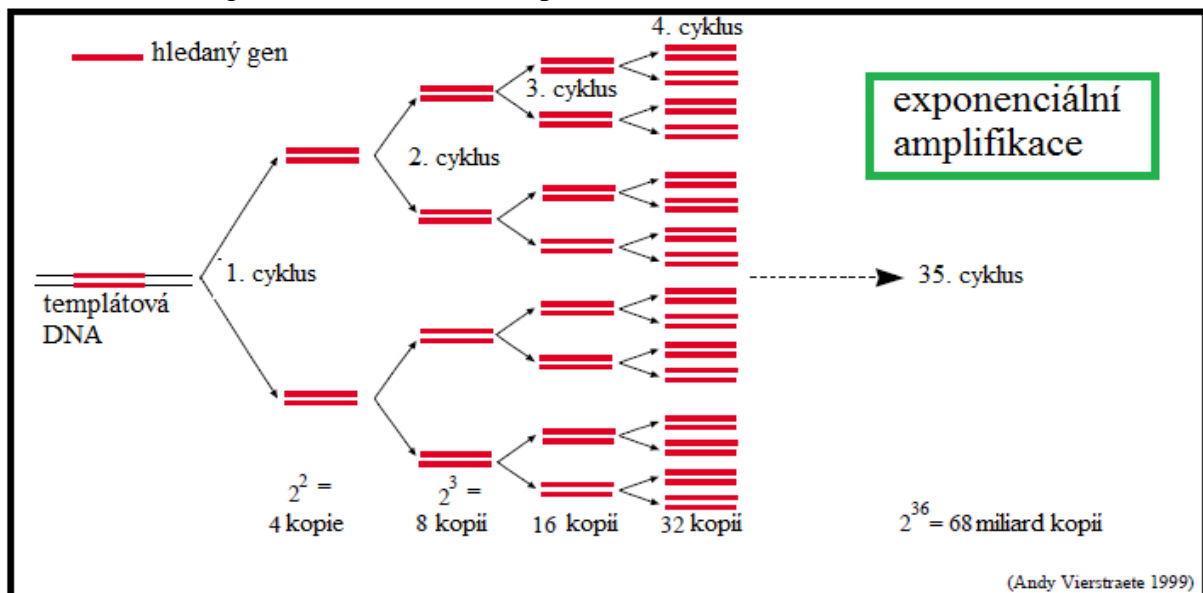
Obrázek 3.1.: Schéma PCR v jednotlivých krocích



(zdroj: Andrew Vierstraete, 1999)

Premix pro PCR obsahuje: primery, dNTP,  $MgCl_2$  a DNA polymerasu. Jako primery se označují synteticky vyrobené oligonukleotidy o velikosti 10 – 30 nukleotidů. Volné deoxynukleotid trifosfáty (dNTP) jsou dodávány ve formě  $Na^+$  nebo  $Li^+$  solí.  $Mg^{2+}$  ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a ovlivňují aktivitu enzymu. pH reakční směsi se obvykle pohybuje v rozmezí 8,3 – 9,0. Během real – time PCR je měřen přírůstek množství produktu během amplifikace. Při kvantifikaci amplikonů se využívají sondy značené fluorescenčním barvivem. V současnosti se v PCR nejvíce uplatňují duálně fluorescenčně značené sondy. Tyto sondy kromě fluoroforu obsahují také tzv. zhášec, molekulu která přijímá z fluoroforu emitované světlo a způsobuje jeho rozptýlení. Na tomto principu pracuje i TaqMan technologie, která využívá 5'-exonukleázové aktivity. Oligonukleotid obsahující fluorescenční barvu na 5' konci a zhášec na 3' konci se specificky váže na amplifikovanou sekvenci. Při syntéze komplementárních vláken je sonda rozkládána 5'-exonukleázou a fluorofor se dostává do větší vzdálenosti od zhášeče, který již nemůže absorbovat emitované záření, čímž dochází k fluorescenci.

Obrázek 3.2.: Exponenciální nárůst PCR produktu

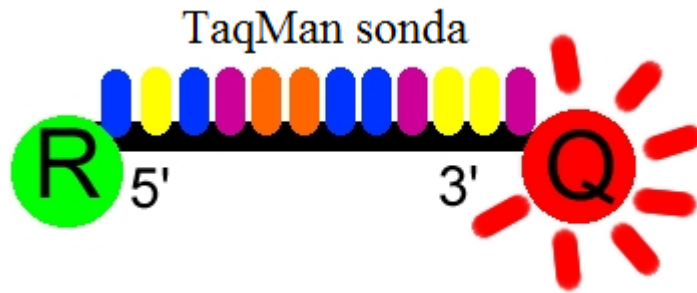


Během qRT-PCR je měřen přírůstek množství produktu během amplifikace. Při kvantifikaci amplikonů se využívají sondy značené fluorescenčním barvivem. V současnosti se nejvíce uplatňují duálně značené fluorescenční sondy. Tyto sondy obsahují fluorofor a jeho zhášec, což je molekulu, která přijímá fluoroforem emitované světlo a způsobuje jeho rozptýlení.

Na tomto principu pracuje i TaqMan technologie, která využívá 5'-exonukleázové aktivity. Oligonukleotid obsahující fluorescenční barvu na 5' konci a zhášec na 3' konci se specificky váže na amplifikovanou sekvenci. Při syntéze komplementárních vláken je sonda rozkládána 5'-exonukleázou a fluorofor se dostává do větší vzdálenosti od zhášeče, který již nemůže absorbovat emitované záření, čímž dochází k fluorescenci.

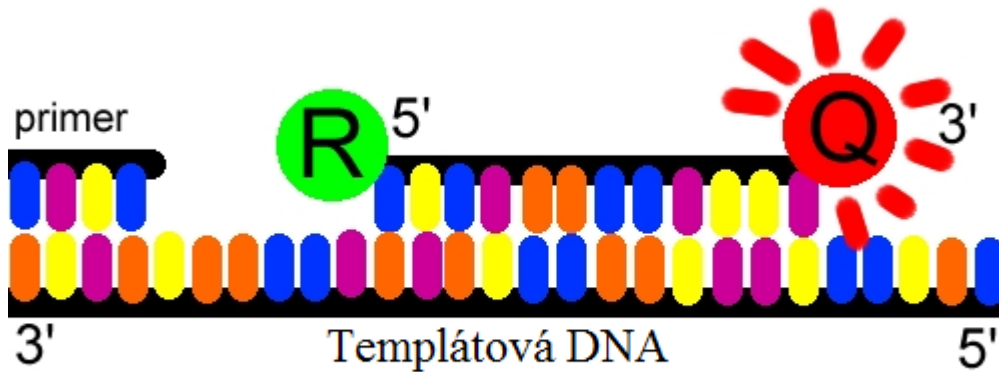
Obrázek 3.3.:

TaqMan sonda s fluoroforem (R) a jeho zhášecem (Q). Zhášec pohlcuje záření emitované fluoroforem. Fluorescence není měřitelná.



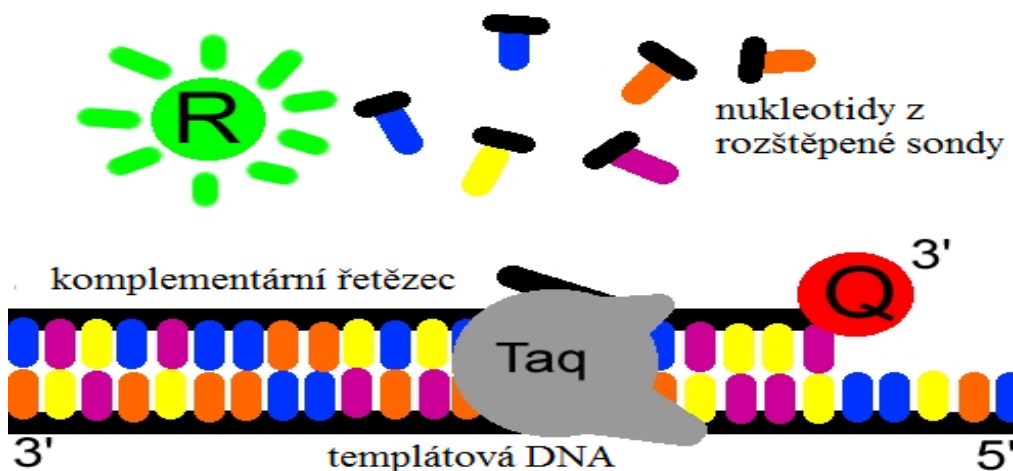
Obrázek 3.4.:

TaqMan sonda je navázána na vnitřní část amplifikované sekvence templátové DNA a dochází k elongaci řetězce ve směru od 5' k 3'. Zhášec je v blízkosti fluoroforu, takže k fluorescenci nedochází.



Obrázek 3.5.:

Polymeráza štěpí díky své exonukleázové aktivitě sondu. Dochází k oddálení fluoroforu a zhášec, což se projeví vzestupem fluorescence.



(zdroj: bio.davidson.edu)

### 3.9. Vyhodnocení výsledků



K analýze výsledků byl použit software 7500 Fast. Prvním krokem v základní analýze dat bylo nastavení úrovně fluorescence (treshold). Threshold se nastavila tak, aby v křivce nárůstu produktu ležela v logaritmické části. Automaticky byla nastavena base line, která slouží k oddělení šumu a signálu. Koncentrace u kalibrační křivky se nastavili, tak aby koncentrace u ředění 1:10 byla rovna 1, u ředění 1:100 byla rovna 0,1 a u ředění 1:1 000 byla rovna 0,01. Relativní kvantita exprese genů se vypočítá pomocí vzorce:

$$R = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{\text{target}} \text{ (kontrola-vzorek)}}}{E_{\text{housekeeping}}^{\Delta C_{\text{housekeeping}} \text{ (kontrola-vzorek)}}}$$

Kde E je efektivita vypočtená jako  $E = 10^{-1/\text{směrnice}}$

### 3.10. Přístroje a chemikálie

#### Přístroje

centrifugy (Hettich 32 R, Hettich Universal 16)  
 CO2 inkubátor pro buněčné kultury (Snijders Scientific)  
 Inkubátor (Fisher Scientific)  
 Inverzní mikroskop (Nikon)  
 Mikrovlnná trouba (Daewoo)  
 Peristaltická pumpa (Verder)  
 pH metr (WTW)  
 Digitální teploměr  
 Třepačka (Biometra)  
 Homogenizátor ULTRA-TURRAX T 10 basic (IKA)  
 Spektrofotometr BioMate 3 (Thermo SpeCtronic)  
 Zařízení pro elektroforézu EASY-CAST model B1A (OWL Scientific)  
 Zdroj pro elektroforézu (E-C Apparatus)  
 UV transiluminátor (UPV)  
 Termocykler pro real-time PCR 7500Fast (Applied Biosystems)  
 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 67µm (Silk and Progress)

## **Chemikálie použité při perfuzi jater a při izolaci a kultivaci buněk**

Fetální telecí sérum – FBS (PAA)  
Glutamin (Gibco)  
Hanksův solný roztok 10x koncentrovaný (Gibco)  
Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku 10x koncentrovaný (Gibco)  
Heparin (Zentiva)  
Kolagenáza B (Roche)  
Kultivační médium DMEM (PAA)  
Lidský rekombinantní FGF-1 (Sigma) – zásobní roztok: 10 $\mu$ g FGF-1/ml  
H<sub>2</sub>O s 0,1% albuminu, sterilizován filtrací  
Nembutal  
Optiprep (Axis-Shield)  
Penicilin G, K salt (Serva)  
Proteáza (Roche)  
Streptomycin sulfát (Serva)  
Dimethylsulfoxid (Sigma)

## **Chemikálie použité při výrobě gelu**

Kolagen s potkaních šlach

## **Chemikálie použité při sklizení buněk**

PBS pufr (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,35)  
TS pufr (Tris-HCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, pH 7,40)  
GTC(-) pufr (guanidium izothiokyanát, citrát sodný, sarkosyl)  
GTC(+) pufr (guanidium izothiokyanát, citrát sodný, merkaptoethanol)  
Merkaptoethanol (Serva)

## **Chemikálie použité při izolaci RNA, přečištění RNA a měření její koncentrace**

2M octan sodný (pH 4,0)  
3M octan sodný (pH 5,0)  
Fenol sycený vodou (Fluka)  
Chloroform/isoamylalkohol (Sigma)  
ledový 2-propanol  
75% ethanol  
H<sub>2</sub>O prostá RNáz  
Nucleospin® RNA XS (Macherey-Nagel)  
TRIS-HCl pH 7,5 (tris(hydroxymethyl)aminomethan + HCl)

## **Chemikálie použité při elektroforéze**

Agaróza I (Amresco)  
10x borátový pufr (0,5M kyselina boritá, 50mM tetraboritan sodný, 100mM  
síran sodný, 10mM EDTA)  
Formaldehyd (Fluka)  
Ethidium bromid (Sigma)

Denaturační pufr (formamid, 37% formaldehyd, 10x borátový pufr, glycerol, 2% vodný roztok bromfenolové modři, H<sub>2</sub>O)

### **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 Assay (Applied Biosystems)

### **Sondy použité při PCR**

<b>Gen</b>	<b>GenBank přístupové číslo</b>	<b>Katalogové číslo</b>
18 S	NR_003286.2	Hs03003631_g1
Col 1 a 2	NM_053356.1	Rn00584426_m1
Spp-1 (osteopontin)	NM_012881.2	Rn00563571_m1
MMP-9 (želatináza B)	NM_031055.1	Rn00579162_m1
MMP-13 (kolagenáza 3)	NM_133530.1	Rn01448194_m1
TIMP-1	NM_053819.1	Rn00587558_m1

### **Použitý software**

7500 Fast System SDS Software version 1.3.1

Microsoft Excel 2003

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K našim experimentům jsme využili laboratorní potkany kmene Sprague-Dawley o hmotnosti cca. 400 gramů, u nichž jsme provedli perfuzi jater, následně játra vyjmuli. Získali jsme tak neparenchymovou buněčnou frakci a dále jsme frakci HSC centrifugací v hustotním gradientu. Dále jsme z této frakce získali opakovaným pasážováním kulturu jaterních HSC.

V experimentech jsme se zpočátku zaměřili na rozdíly v kultivaci buněk na plastu a na kolagenním gelu po ovlivnění buněk růstovým faktorem FGF-1 a poté i heparinem a zároveň i na to, jak různé koncentrace těchto faktorů mění velikost exprese sledovaných genů.

Poté jsme se zaměřili na spolupůsobení faktoru FGF-1 a heparinu při ovlivňování genové exprese a opět jsme sledovali rozdíly při kultivaci na plastu a na kolagenním gelu. Zde jsme přímo navázali na práci „Vliv růstových faktorů na expresi genů v jaterních myofibroblastech“, Mgr. Evy Peterové, která se jako první diplomantka začala zabývat kombinací FGF-1 a heparinu, resp. jejím vlivem na buňky. Na závěr jsme zjišťovali, jak působí na buňky samotný heparin.

Používali jsme koncentrační řadu faktoru FGF-1 (4, 10, 25 ng/ml), poté s koncentrační řadu heparinu (0,1; 1; 10 μg/ml) v kombinaci s 10 ng/ml FGF-1, nakonec samotný heparin o koncentraci 10 μg/ml.

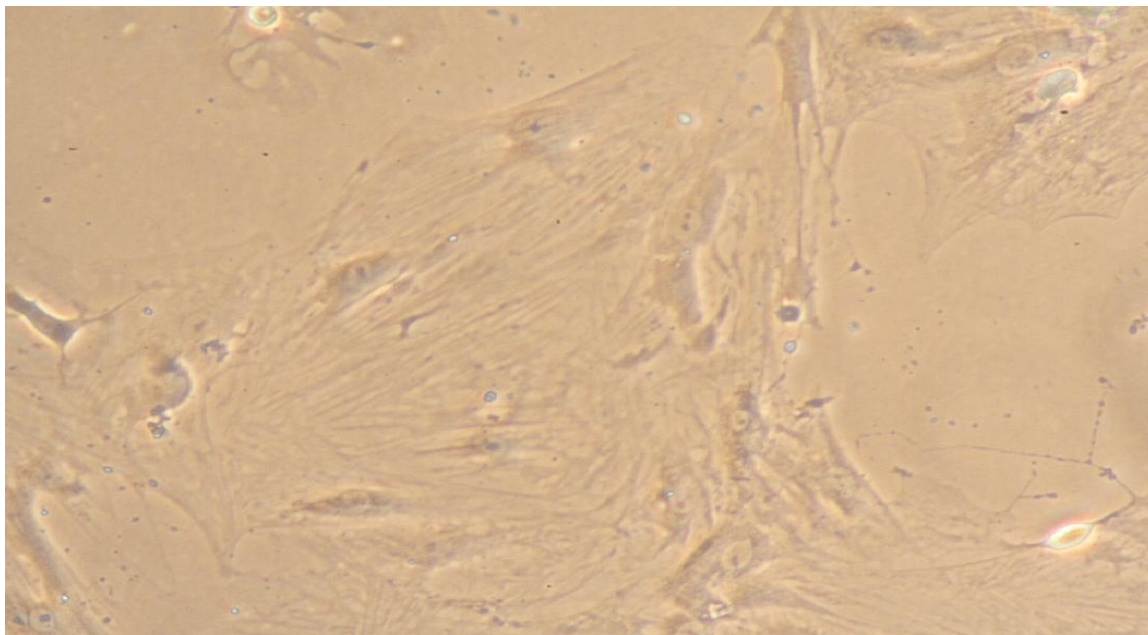
U všech experimentů jsme zohlednili dobu působení FGF-1 na buňky. Na základě výsledků práce „Expres genů v jaterních fibroblastech kultivovaných v trojrozměrné matrix“ Mgr. Petry Čevelové, která mj. sledovala i závislost doby působení FGF-1 na expresi genů, jsme stanovili optimální dobu působení na 12 hodin.

Všechna naměřená data byla statisticky zpracována pomocí Studentova t-testu s hladinou významnosti ( $p < 0,05$ ).

### 4.1. Morfologie buněk

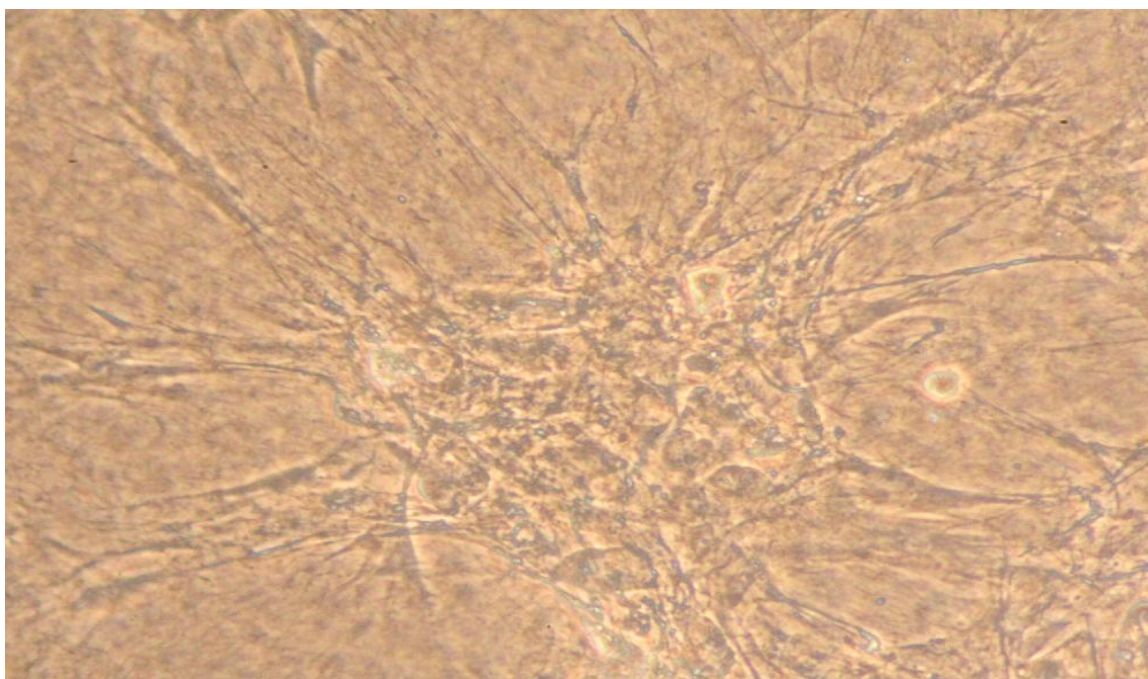
Na obrázcích 4.1. a 4.2. jsou myofibroblasty kultivované na plastu a na kolagenním gelu po dobu dvanácti hodin. Obrázek 4.1 ukazuje myofibroblasty kultivované na polystyrenové Petriho misce. Buňky jsou oválné, protáhlé s velkým tělem s dobře patrnými jádry a občasnými výběžky. Na obrázku 4.2. jsou pak buňky kultivované v kolagenním gelu. Takto kultivované myofibroblasty se vyskytují převážně ve shlucích, mají úzká protáhlá těla s dobře viditelnými protáhlými cytoplazmatickými výběžky

Obrázek 4.1.  
Myofibroblasty kultivované na plastu 12 hodin, zvětšení 100x



(zdroj: DP)

Obrázek 4.2.  
Myofibroblasty kultivované na kolagenním gelu 12 hodin, zvětšení 100x



(zdroj: DP)

## 4.2. Genová exprese na plastru

V tabulce 4.1. jsou průměrné hodnoty relativní genové exprese stanovovaných genů buněk kultivovaných na plastru po 12 hodinovém působení FGF-1 o různých koncentracích. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Za 100 % je zde považována kontrolní buněčná kultura neovlivněná FGF-1 (kontrola). Hodnota „n“ udává počet hodnot relativní exprese, ze kterých byl u té které koncentrace FGF-1 vypočítán průměr.

Tabulka 4.1. Expresse genů na plastru po ovlivnění FGF-1; hodnoty v procentech kontroly

	kontrola	FGF-1 4 ng/ml	FGF-1 10 ng/ml	FGF-1 25 ng/ml
Col 1a2	100 $\pm$ 0	118 $\pm$ 15	113 $\pm$ 19	112 $\pm$ 11
TIMP-1	100 $\pm$ 0	147 $\pm$ 14*	123 $\pm$ 15*	172 $\pm$ 12
Spp	100 $\pm$ 0	181 $\pm$ 29	205 $\pm$ 81	205 $\pm$ 35*
MMP-9	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 27	165 $\pm$ 58	93 $\pm$ 15
MMP-13	100 $\pm$ 0	147 $\pm$ 14	123 $\pm$ 15	172 $\pm$ 12
n	7	3	6	4

Jako \* je označena statisticky významná změna exprese ( $p < 0,05$ )

V tabulce 4.2. se nacházejí hodnoty relativní exprese po působení FGF-1 o koncentraci 10 ng/ml bez heparinu a s různými koncentracemi heparinu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Za 100 % je zde považována kontrolní buněčná kultura neovlivněná FGF-1 (kontrola).

Tabulka 4.2. Expresse genů na plastru po ovlivnění FGF-1a různými koncentracemi heparinu; hodnoty v procentech kontroly

	kontrola	FGF-1 10 ng/ml	Heparin 0,1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml	Heparin 1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml	Heparin 10 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml
Col 1a2	100 $\pm$ 0	113 $\pm$ 19	111 $\pm$ 7	98 $\pm$ 12	143 $\pm$ 12
TIMP-1	100 $\pm$ 0	200 $\pm$ 71	150 $\pm$ 4*	189 $\pm$ 21*	302 $\pm$ 45
Spp	100 $\pm$ 0	205 $\pm$ 81	202 $\pm$ 32	223 $\pm$ 74	1012 $\pm$ 564
MMP-9	100 $\pm$ 0	165 $\pm$ 58	82 $\pm$ 18	81 $\pm$ 17	123 $\pm$ 4
MMP-13	100 $\pm$ 0	142 $\pm$ 28	241 $\pm$ 101	268 $\pm$ 92	860 $\pm$ 158
n	7	6	3	4	2

Jako \* je označena statisticky významná změna exprese ( $p < 0,05$ )

V tabulce 4.3. se nacházejí hodnoty relativní exprese po působení FGF-1 o koncentraci 10 ng/ml v kombinaci koncentracemi heparinu 0,1; 1 a 10. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Za 100 % je zde ovšem považována kontrolní buněčná kultura ovlivněná FGF-1 o koncentraci 10 ng/ml (kontrola).

Tabulka 4.3. Expres genů na plastu po ovlivnění FGF-1 v kombinaci s různými koncentracemi heparinu; hodnoty v procentech kontroly.

	FGF-1 10 ng/ml kontrola	Heparin 0,1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml	Heparin 1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml	Heparin 10 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml
Col 1a2	100 $\pm$ 0	129 $\pm$ 18	111 $\pm$ 17	130 $\pm$ 27
TIMP-1	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 8	143 $\pm$ 37	170 $\pm$ 47
Spp	100 $\pm$ 0	114 $\pm$ 27	171 $\pm$ 42	378 $\pm$ 206
MMP-9	100 $\pm$ 0	64 $\pm$ 16	81 $\pm$ 13	149 $\pm$ 42
MMP-13	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 40	176 $\pm$ 51	338 $\pm$ 79
n	7	4	5	5

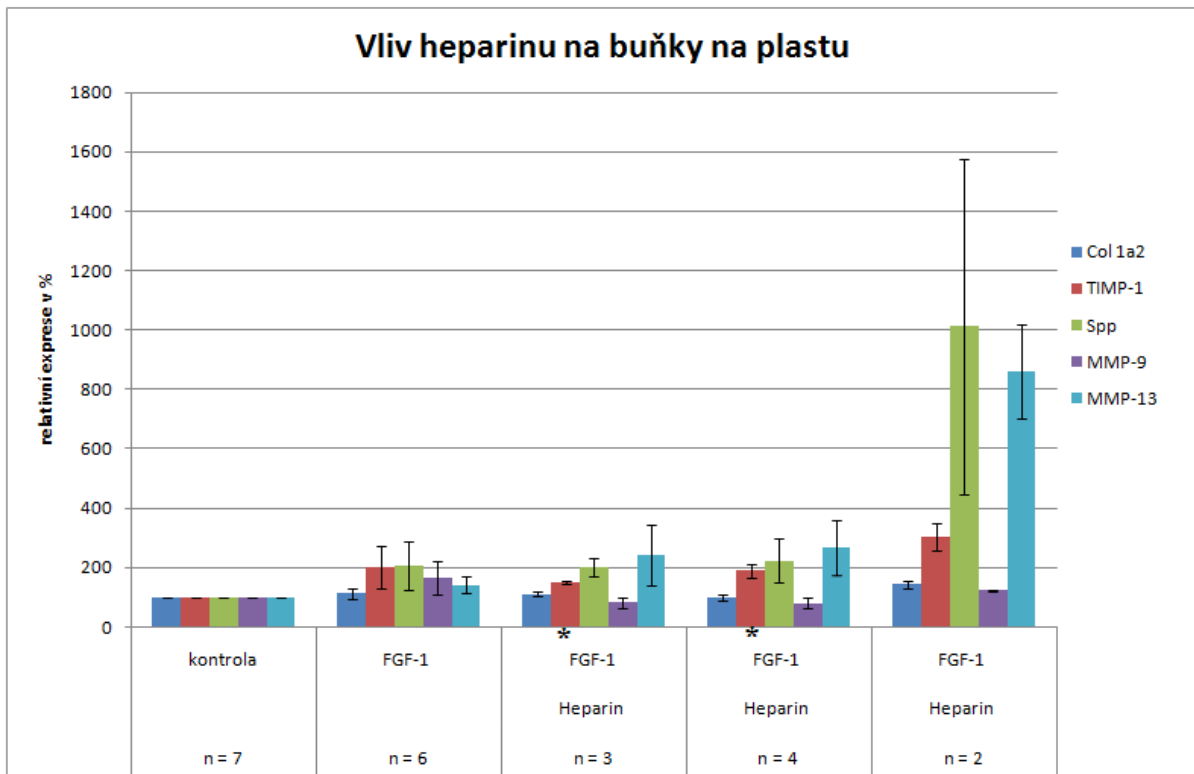
V tabulce 4.4. jsou hodnoty relativní exprese bez působení růstových faktorů a po působení heparinu bez FGF-1. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Za 100 % je zde považována kontrolní buněčná kultura neovlivněná FGF-1 ani heparinem (kontrola).

Tabulka 4.4. Expres genů na plastu po ovlivnění heparinem; hodnoty v procentech kontroly.

	kontrola	Heparin 10 $\mu$ g/ml
Col 1a2	100 $\pm$ 0	177 $\pm$ 23
TIMP-1	100 $\pm$ 0	123 $\pm$ 16
Spp	100 $\pm$ 0	200 $\pm$ 71
MMP-9	100 $\pm$ 0	71 $\pm$ 38
MMP-13	100 $\pm$ 0	238 $\pm$ 93
n	3	2

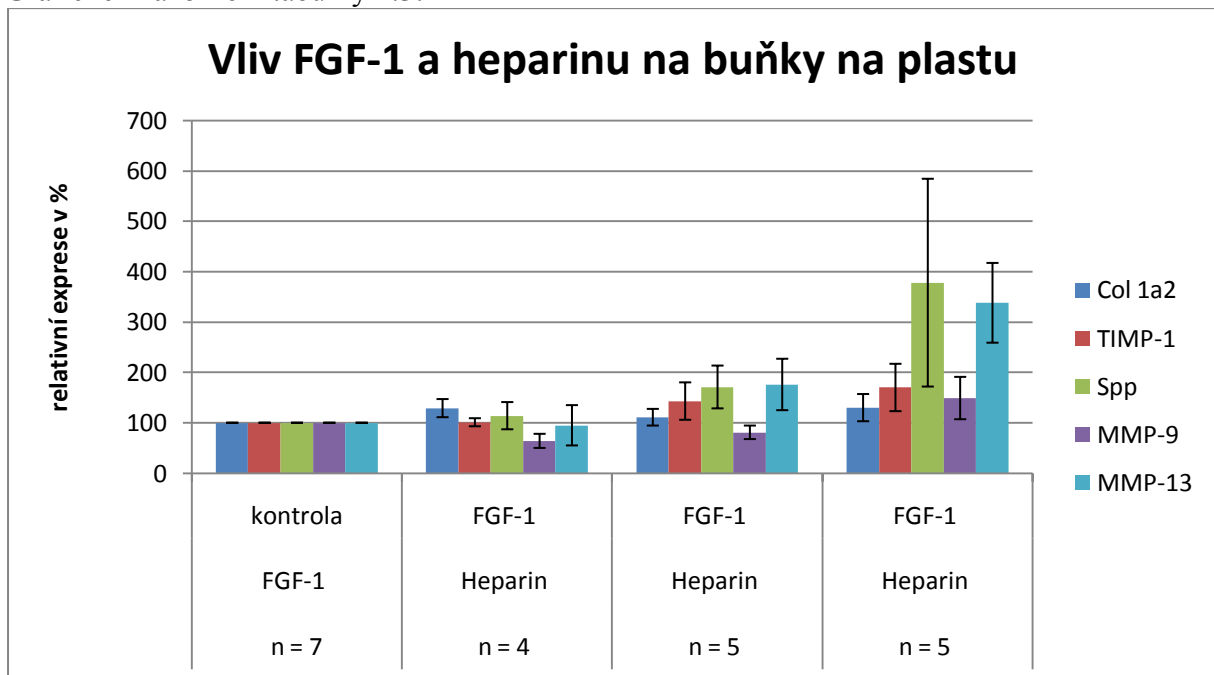
Graf 4.1.

Grafické znázornění, jak FGF-1 v kombinaci s heparinem o koncentracích 0,1; 1 a 10 µg/ml ovlivňuje buňky kultivované na plastu. Hodnoty v procentech kontroly. Znázorněny jsou i standardní chyby průměru. Grafické znázornění tabulky 4.2.



Graf 4.2.

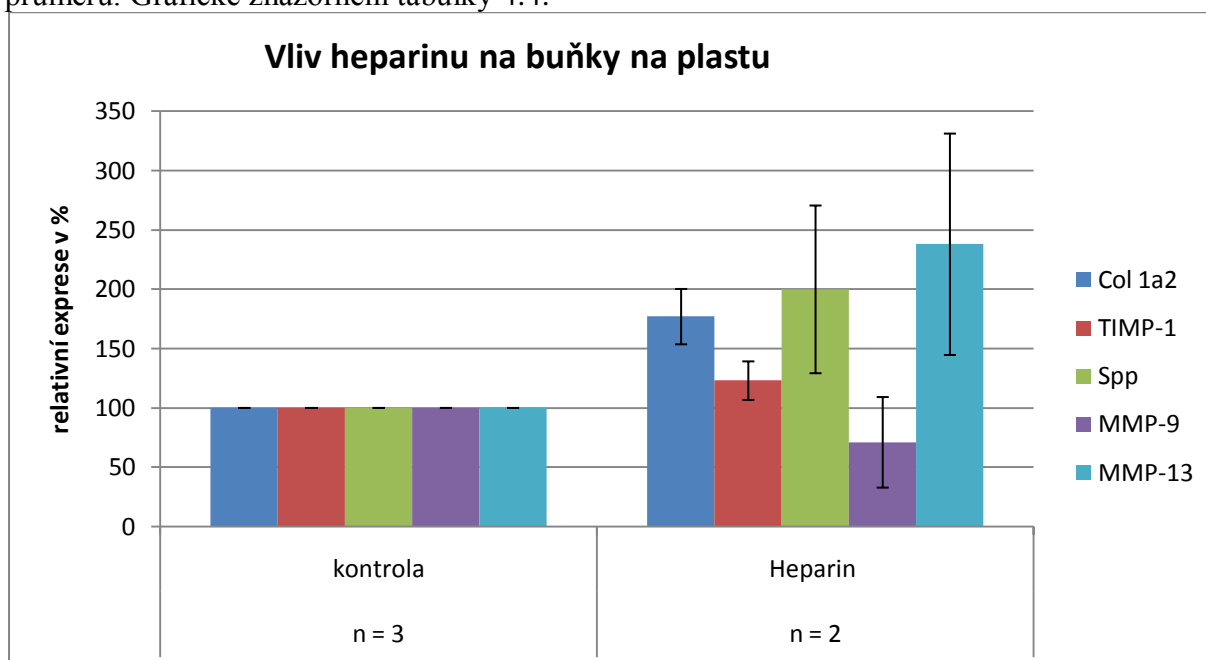
Grafické znázornění, jak FGF-1 v kombinaci s heparinem ovlivňuje buňky kultivované na plastu. Hodnoty v procentech kontroly. Znázorněny jsou i standardní chyby průměru. Grafické znázornění tabulky 4.3.





Graf 4.3.

Graf znázorňuje, jak heparin o koncentraci 10 µg/ml bez FGF ovlivňuje genovou expresi buněk na plastru. Hodnoty v procentech kontroly. Znázorněny jsou i standardní chyby průměru. Grafické znázornění tabulky 4.4.



### 4.3. Genová exprese na kolagenním gelu

V tabulce 4.5. jsou uvedeny průměrné hodnoty relativní exprese stanovovaných genů buněk kultivovaných v kolagenním gelu po 12 hodinovém působení FGF-1 o různých koncentracích. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny v procentech, kdy kontrolní buněčná kultura bez FGF-1 je brána jako 100 %. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech ± SME (standardní chyba průměru). Expresse byla normalizována na 18S RNA.

Tabulka 4.5. Expresse genů na kolagenním gelu po ovlivnění FGF-1; hodnoty v procentech kontroly.

	kontrola	FGF-1 4 ng/ml	FGF-1 10 ng/ml	FGF-1 25 ng/ml
Col 1a2	100±0	91±14	59±13*	87±47
TIMP-1	100±0	168±38	70±11	82±26
Spp	100±0	197±104	113±27	134±53
MMP-9	100±0	176±32	94±19	79±38
MMP-13	100±0	381±96	169±28	522±264
n	6	3	6	3

Jako \* je označena statisticky významná změna exprese ( $p < 0,05$ )

Tabulka 4.6. ukazuje průměrné hodnoty relativní exprese stanovovaných genů buněk kultivovaných v kolagenním gelu po 12 hodinovém působení FGF-1 o koncentraci 10 ng/ml a heparinu o koncentracích 0,1 a 1 µg/ml. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny v procentech, kdy kontrolní buněčná kultura o koncentraci 10 ng/ml FGF-1 je brána jako 100 %. Výsledné

hodnoty jsou uvedeny jako průměrná hodnota exprese v procentech  $\pm$  SME (standardní chyba průměru).

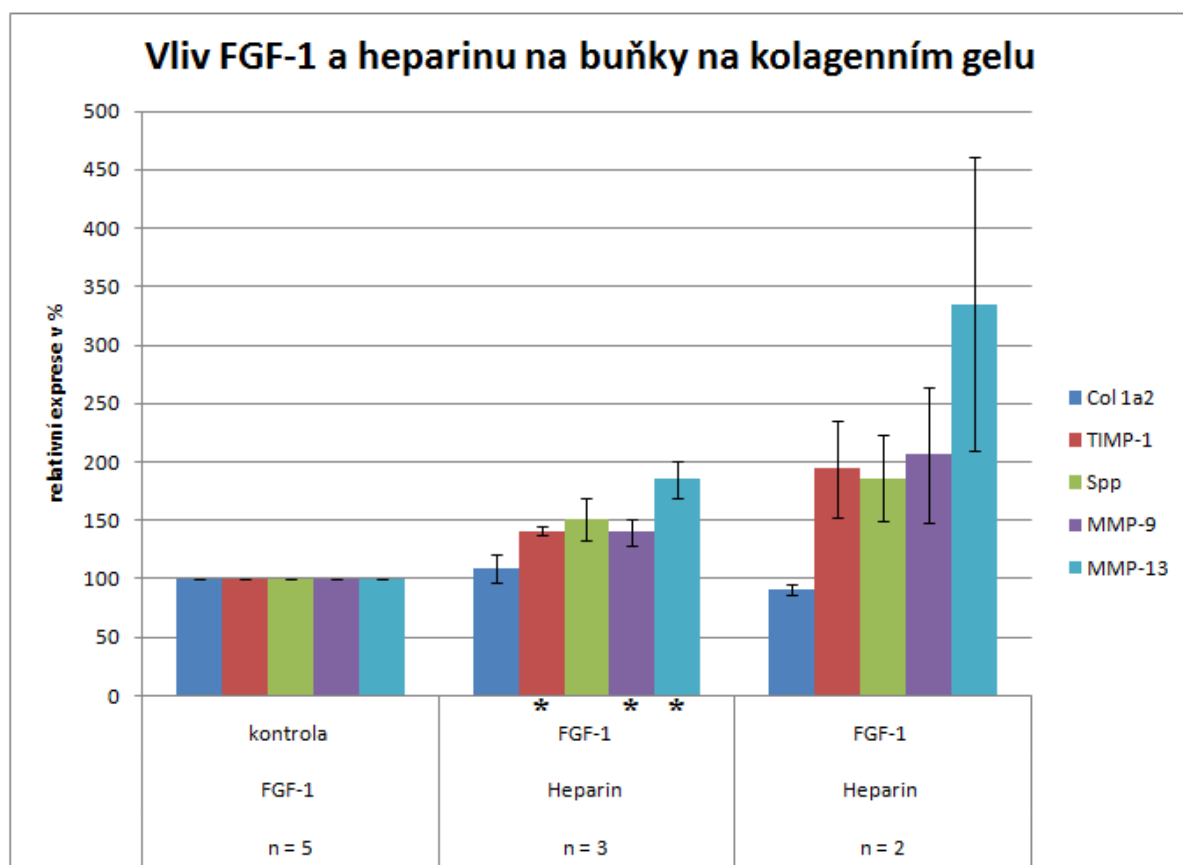
Tabulka 4.6. Exprese genů na kolagenním gelu po ovlivnění FGF-1 a různými koncentracemi heparinu; hodnoty v procentech kontroly.

	FGF-1 10 ng/ml kontrola	Heparin 0,1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml	Heparin 1 $\mu$ g/ml FGF-1 10 ng/ml
Col 1a2	100 $\pm$ 0	109 $\pm$ 12	91 $\pm$ 4
TIMP-1	100 $\pm$ 0	141 $\pm$ 4*	194 $\pm$ 41
Spp	100 $\pm$ 0	151 $\pm$ 18	186 $\pm$
MMP-9	100 $\pm$ 0	144 $\pm$ 12*	206 $\pm$ 57
MMP-13	100 $\pm$ 0	185 $\pm$ 16*	335 $\pm$ 126
n	5	3	2

Jako \* je označena statisticky významná změna exprese ( $p < 0,05$ )

Graf 4.5.

Tento graf znázorňuje, jak FGF-1 o koncentraci 10 ng/ml v kombinaci s heparinem o koncentracích 0,1 a 1  $\mu$ g/ml ovlivňuje buňky na kolagenním gelu. Hodnoty v procentech kontroly. Znázorněny jsou i standardní chyby průměru. Graf vychází z tabulky 4.6.



Jako \* je označena statisticky významná změna exprese ( $p < 0,05$ )

## 5. DISKUSE

V této práci jsme studovali expresi celkem pěti genů myofibroblastů ovlivňovaných růstovým faktorem FGF-1 v kombinaci s heparinem. Buňky jsme pěstovali jednak ve dvourozměrném prostředí (2D) na polystyrenových Petriho miskách tak i v trojrozměrném prostředí (3D) kolagenního gelu. Jako 3D kultivační prostředí jsme zvolili kolagen typu I.

Jako dobu působení růstového faktoru jsme zvolili dvanáct hodin. Tuto dobu jsme zvolili na základě poznatků z diplomové práce Mgr. Petry Čevelové.

Ověřovali jsme účinek 3 různých koncentrací FGF-1, 4, 10 a 25 ng/ml, a ve shodě s pracemi Petry Čevelové a Evy Peterové jsme zvolili koncentraci 10 ng/ml FGF-1.

V našich experimentech byla závislost koncentrace FGF-1 na jeho účinku na genovou expresi velmi malá. Někdy byly i nižší koncentrace účinné a to jak na plastu tak i na kolagenním gelu, což je patrné z tabulek 4.1. a 4.5. Avšak za statisticky významné změny exprese lze považovat zvýšení exprese genu pro Col 1a2 u koncentrace 10 ng/ml FGF-1 u buněk na kolagenním gelu a genu pro TIMP-1 u koncentrací 4 a 10 ng/ml u buněk kultivovaných na plastu.

Výsledky Evy Peterové naznačují, že po přidání FGF-1 k buňkám se výrazněji změnila hladina MMP-13. Naše výsledky toto potvrzují. Na kolagenním gelu došlo po přidání FGF-1 k buňkám rovněž ke zvýšení exprese tohoto genu o 281 %, o 69 % a o 422 % (koncentrační řada 4, 10 a 25 ng/ml FGF-1), jak ukazuje tabulka 4.5. Přičemž na hranici statistické významnosti se pohybuje pouze zvýšení exprese o 69%. Zároveň však došlo ke statisticky významnému snížení exprese genu pro Col 1a2 u koncentrace 10 ng/ml FGF-1. Rovněž u buněk kultivovaných na plastu byl zaznamenán mírný vzestup exprese genů pro MMP-13 o 47 %, o 23 % a o 72 % (opět koncentrační řada FGF-1) dle tabulky 4.1., žádné zvýšení přitom není statisticky významné. Dále došlo i ke zvýšení exprese genu pro osteopontin o 81 %, o 105 % a o 105 % (koncentrační řada), jak opět ukazuje tabulka 4.1. Zde má statistickou významnost pouze zvýšení o 105 % u koncentrace FGF-1 25 ng/ml. Z výsledků je tedy zřejmé, že koncentrace FGF-1 není v přímé úměře s hodnotou genové exprese a zřejmě ani v žádné jiné závislosti a v některých kultivačních modelech způsobila nižší koncentrace FGF-1 dokonce vyšší expresi daného genu než vyšší koncentrace FGF-1. Lze ale konstatovat, že FGF-1 genovou expresi MMP-13 respektive Spp celkově zvyšuje, což je v souladu s naším očekáváním. Dále exprese genu pro MMP-13 byla po přidání FGF-1 vyšší po kultivaci na kolagenním gelu než po kultivaci na plastu, což naznačuje, že prostředí kolagenu indukuje v buňkách tvorbu kolagenasy.

Dále jsme u experimentálního modelu kolagenního gelu, kde bylo 100 % vztaženo na koncentraci 10 ng/ml FGF-1, zaznamenali statisticky významné zvýšení exprese některých genů po přidavku 0,1 μg/ml heparinu. Bylo to zvýšení exprese genu pro MMP-9 o 44 %, genu pro MMP-13 o 85 % a pro TIMP-1 o 41 %. Heparin tedy zvyšuje účinky růstového faktoru FGF-1.

V další části experimentu jsme přímo navázali na práci Evy Peterové a pokusili se zjistit, jak heparin v kombinaci s FGF-1 ovlivňuje expresi daných genů.

Všechny FGF růstové faktory mají vysokou afinitu k heparinu, díky čemuž heparin hraje důležitou roli na tvorbě účinných FGF/FGFR signalizačních komplexů. Takže heparin zvyšuje biologické funkce těchto faktorů (Woods a spol., 2000), což se i v našich experimentech projevilo zvýšenou expresí některých genů po přidání heparinu k FGF a to jak při kultivaci na plastu, tak i na kolagenním gelu.

Při kultivaci na gelu a po přidavku heparinu se výrazně zvýšila především exprese genů pro MMP-13 a Spp ale i TIMP-1. Po přidavku 0,1 μg/ml a 1 μg/ml heparinu k 10 ng/ml FGF-1 k buňkám na kolagenním gelu se exprese MMP-13 zvýšila o 85 % resp. o 235 %, přičemž

statisticky významné je zvýšení exprese o 85 %. Exprese genu pro osteopontin se zvýšila o 51 % resp. o 86 %, zde žádné zvýšení nemá statistickou významnost. A nakonec exprese genu pro TIMP-1 byla zvýšená o 41 %, resp. o 94 %, statisticky významné je zvýšení o 41 %. Toto je patrné za tabulky 4.6.

Při kultivaci buněk na plastu jsme zaznamenali výraznější zvýšení genové exprese u MMP-13 a osteopontinu a TIMP-1. K buňkám bylo přidáno 10 ng/ml FGF-1 a poté heparin v koncentracích 0,1 µg/ml, 1 µg/ml a 10 µg/ml. Genová exprese u MMP-13 se zvýšila o 141 %, resp. o 168 % a o 760 % a exprese genů pro osteopontin se zvýšila o 102 %, resp. o 123 % a 912 % , jak znázorňuje tabulka 4.2. Na hranici statistické významnosti je pouze zvýšení o 102 % u osteopontinu. Dále u TIMP-1 došlo ke zvýšení exprese o 50 %, resp. o 89 % a o 202 %, kde statisticky významné bylo zvýšení o 50 a 89 %.

Z těchto výsledků je zřejmé, že i po ovlivnění heparinem je zvýšená především exprese genů pro MMP-13 a osteopontin a vzhledem ke zjištěným hodnotám relativní genové exprese se ukázalo, že heparin opravdu zesiluje účinek FGF-1, jak je popsáno výše.

V poslední části našich experimentů jsme se zaměřili na sledování genové exprese po ovlivnění buněk pouze heparinem, čímž jsem také navázali na práci Evy Peterové, která tento experiment neprováděla. Jako kultivační médium jsme zde použili plast i kolagenní gel. Bohužel na kolagenním gelu se experiment nepovedl, takže uvedené výsledky jsou pouze z plastu. Zvolili jsme koncentraci heparinu 10 µg/ml a porovnávali jsme expresi s kontrolní skupinou bez FGF-1 a bez heparinu, kterou jsme určili za 100 %. Výrazné zvýšení exprese bylo zaznamenáno u genů pro Col 1a2, osteopontin a MMP-13. Exprese pro Col 1a2 se zvýšila o 77 %, u osteopontinu o 100% a u MMP-13 o 138 % poté, co byly buňky ovlivněny heparinem. Žádné zvýšení však není statisticky významné.

Z výsledků vyplývá, že i samotný heparin zvyšuje expresi daných genů, avšak ne tak výrazně jako v kombinaci s heparinem

## 6. ZÁVĚR

Jaterní myofibroblasty jsou vedle jaterních hvězdicových buněk hlavním zdrojem vaziva ve fibrotických játrech. Exprese genů v těchto buňkách při kultivaci in vitro se liší podle toho, jestli jsou buňky pěstovány na plastových miskách nebo v kolagenním gelu, který lépe napodobuje prostředí ve tkáni. Testovali jsme geny důležité pro tvorbu a ukládání vaziva, kolagen 1a2, metaloproteasy MMP-13 a MMP-9, inhibitor metaloproteas TIMP-1 a osteopontin. Exprese těchto genů v MFB je ovlivněna přidáním růstového faktoru FGF-1 do kultivačního media. Závislost exprese genů na koncentraci FGF-1 není lineární. Účinek FGF-1 je potencován heparinem. Nejúčinnější byla koncentrace heparinu 10 µg/ml media. Určité, i když slabší účinky má i samotný heparin.

## 7. Seznam použité literatury

- 1) Adams EF et al, Autocrine control of human meningioma proliferation: secretion of platelet-derived growth factor-like molecules. *International J Cancer*, 398-402 (1991)
- 2) Arthur MJ, Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *J. Gastroenterol*, 1525–1528 (2002)
- 3) Bachem MG et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts, *J. Cell Pathol.*, 123-130 (1993)
- 4) Benyon RC et al., Is liver fibrosis reversible ? *J Gut* , 443-446 (2000)
- 5) Bigg HF et al, Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal, *J. Biol. Chem.*, 10846-10851 (1999)
- 6) Bord S et al Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone* 7-12 (1998)
- 7) Brew K et al, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function., *Biochim Biophys Acta*, 267-83. (2000)
- 8) Bučinská I., Mechanismy působení hypoxie na remodelaci koronárního oběhu, bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (2009)
- 9) Busletta Ch et al, Hepatic Myofibroblasts in Liver Fibrogenesis, Dept. of Experimental Medicine and Oncology, Faculty of Medicine and Surgery, University of Torino (2003)
- 10) Cassiman D et al., Hepatic stellate cell/myofibroblasts subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.*, 200-209 (2002)
- 11) Cytokines & Cell Online Pathfinder Encyclopedia, přístupné z <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=aFGF>, aktuální k 8.3.2012
- 12) Duchesne L et al, N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding. *J. Biol. Chem.*, 27178–27189 (2006)
- 13) Ehrman J a kol. *Hepatologie*, Grada, str. 402 (2010)
- 14) Evrosimovska B et al, Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases), *J Cell and Animal Biol*: 113-120 (2011)
- 15) Fan J et al, Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of Smad1 and ERK1/2 in rat hepatic stellate cells, *J. Cell. Physiol.*, 499-505, (2006)
- 16) Forbes SJ et al, Liver fibrogenic cells, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25 (2011), page 207–217
- 17) Friedman SL, Mechanisms of Hepatic Fibrosis and Therapeutic Implications: Treatment of Hepatic Fibrosis, *Nat. Clin. Pract. Gastroent. Hepatol.* (2004)
- 18) Friedman SL, Anti-fibrotic Therapy in Hepatitis C, *Hot Topics in Liver Disease*, Houston (2010)

- 19) Friedman SL, Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury, *J. Biol. Chem.*, 2247-2250 (2000)
- 20) Friedman, S.L. (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 275, 2247-2250 (Obrázek převzat od Friedman SL, publikuji s laskavým svolením Dr. Friedmana)
- 21) Gaire M et al, Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J. Biol. Chem.*, 2032-2040 (1994)
- 22) Harvey L. et al, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix, *Mol. Cell. Biol.* (2000)
- 23) Hasman L. Studium aktivit MMP při hojení ran u zdravých a diabetických potkanů ZDF, Diplomová práce, Lékařská fakulta UK Hradec Králové, str. 12 – 13 (2011)
- 24) Heldin C-H, Structural and functional studies on platelet-derived growth factor, *The EMBO Journal*, 4251 – 4259 (1992)
- 25) Hideaki N et al., Matrix Metalloproteinases, minireview, *J. Biol. Chem.*, 21491–21494 (1999)
- 26) Iredale JP et al, Mechanisms of Spontaneous Resolution of Rat Liver Fibrosis, Hepatic Stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors *J. Clin. Invest.*, 38–549 (1998)
- 27) Jing-Ting L et al, Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies, *J. Gastroenterol.* (2008)
- 28) Klener P. a kol., Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, Grada, str. 209 (2010)
- 29) Knäuper V et al, , Biochemical characterization of human collagenase-3, 1, *J. Biol. Chem.* 1544 -1550 (1996)
- 30) Koo B-H et al, Thrombin-dependent MMP-2 Activity Is Regulated by Heparan Sulfate, *J. Biol. Chem.*, 41270–41279, (2010)
- 31) Kähäri V-M et al., Matrix metalloproteinases in skin, *J. Exp. Dermatol.* 199-213 (1997)
- 32) Lafleur MA et al, Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane type matrix metalloproteinases, *J. Cell Sci.*, 3427-3438 (2002)
- 33) Lambert E et al, TIMPs as multifacial proteins, *Crit. Rev. Oncol./Hematol*, 187–198 (2004)
- 34) Li D et al., Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation, *J Biol. Pathobiol.*, 455-468 (2001)
- 35) Li D et al., Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy, *J. Gastroent. Hepatol.*, 618-633 (1999)
- 36) Marini S et al, Cleavage of bovine collagen I by neutrophil collagenase MMP-8. Effect of pH on the catalytic properties as compared to synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* 18657-18663 (2000)
- 37) Martínek J a kol., Histologický atlas nakl. Grada str. 41 – 43 (2009)
- 38) Moilanen M et al Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *J. Biochem.*, 5414-5420 (2003)

- 39) Nečas E a kol., Patologická fyziologie orgánových systémů, část II. 1. vyd., Praha: Nakladatelství Karolinum, Str. 760 (2006)
- 40) Nechutová H, Chronická pankreatitida a hvězdicové buňky zánětu, Disertační práce, Interní hepatogastroenterologická klinika v Brně str. 45 (2006)
- 41) Novo E. et al., Hepatic myofibroblasts: A heterogenous population of multifunctional cells liver fibrogenesis, *J. Biochem. & J. Cell Biol.*, 2089–2093 (2009)
- 42) Obrázek převzat z: Hypertextový atlas patologie, [www.muni.cz/atlasses](http://www.muni.cz/atlasses), Josef Feit et al. ( s laskavým svolením autora MUDr. Josefa Feita Csc., Masarykova Univerzita, Brno)
- 43) Obrázek převzat z: Hubičková L. et al., Histopatologický atlas, str. 2, 3. Lékařská fakulta UK v Praze, (publikuji s laskavým svolením spoluautorky MUDr. Lucie Hubičkové PhD, ústav embriologie a histologie, 3. LF UK Praha)
- 44) Olsen AL et al, Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* G110-G118 (2011)
- 45) Olsen SK et al, Fibroblast Growth factor (FGF) Homologous Factor Share Structural but Not Functional Homology FGFs., *J. Biol. Chem.*, 34226-34236, (2003)
- 46) Omary MB et al, The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases, *J. Clin. Invest.*, 50–59 (2007)
- 47) Ornitz DM et al., Fibroblast growth factors, *Genome Biol.*, 2(3): reviews3005.1–3005.12 (2001)
- 48) Peterová E. Vliv růstových faktorů na expresi genů v jaterních myofibroblastech, Diplomová práce, str. 19 (2011)
- 49) Pinzani M. PDGF and signaltransduction in hepatic stellate cells, *Frontiers Biosci.* 1720-1726 (2002)
- 50) Powers CJ et al, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling, *Endocr Relat Cancer.*165–197 (2000)
- 51) Prikk K et al In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J. Pathol.* 232-238 (2001);
- 52) Razzaque MS, *Fibrogenesis: Cellular and Molecular Basic*, 216 (2005)
- 53) Reeves HL et al, Activation of hepatic stellate cells – a key issue in liver, *Frontiers in Biosci.* 808-826, (2002)
- 54) Remale AG et al, The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), *J. Cell Sci.*, 4975-4984 (2005)
- 55) Santala A et al Activation of interstitial collagenase, MMP-1, by *Staphylococcus aureus* cells having surface-bound plasmin: a novel role of plasminogen receptors of bacteria. *FEBS Letters* 461(3): 153-156 (1999)
- 56) Sato et al, 3-D structure of extracellular matrix regulates gene expression in cultured hepatic stellate cells to induce process elongation, *Comp. Hepatol.* 3(Suppl 1):S4 (2004)
- 57) Sato M. et al, Hepatic Stellate Cells: Unique Charakteristic in Cell Biology and Phenotype, *Cell Struct. Funct.* 105-122, 2003
- 58) Saunders WB et al MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. *J. Cell Sci.* 2325-2340 (2005)



- 59) Schneiderka P., Markery jaterní fibrózy, *Klin. Biochem. Metab.*, , str. 14–18. (2008)
- 60) Schuppan D et al., Matrix as modulator of stellate cell and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 351-372 (2001)
- 61) Sleeman M et al, Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5 J, *Gene*, 27; 271(2) pg.171-182 (2001)
- 62) Stalnikowitz DK, et al, Liver fibrosis and inflammation. A review, *Ann. Hepatol.* 159-163 (2003)
- 63) Strain AJ et al, Liver Growth and repair, *J Gut*; 46:743-745 (2000)
- 64) Svegliati-Baroni et al, Involvement of reactive oxygen species and nitric oxides radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells, *J. Liver*, 21: 1 – 12 (2001)
- 65) Šafka J, Působení potenciálních léčiv na expresi genů v jaterních myofibroblastech, Diplomová práce, str. 17, (2011)
- 66) Špičák J. a kol., Novinky v gastroenterologii a hepatologii, Grada, str. 14 (2010)
- 67) Taimr P et al, Activated Stellate Cells Express the TRAIL Receptor-2/Death Receptor-5 and Undergo TRAIL-Mediated Apoptosis, *J. Hepatol.*, 87-95 (2003)
- 68) Taimr P. a kol, Patogeneze fibrózy jater, *Klinika hepatogastroenterologie – IKEM, bulletin* , 2002
- 69) Takahara T et al, Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: its activation and signaling pathway, *Hepatol.Research*, 318–326 (2003)
- 70) Taylor LP, Heparin Linked Acidic Fibroblast Growth Factor (FGF 1), *Molecular & Behavioral Neuroscience Institute, The University of Michigan*, aktuální k 22.3.2012
- 71) Thiennu H Vu, MMP-9/Gelatinase B Is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes, *J. Cell*, 411–422 (1998)
- 72) Uemura M et al. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol. Biol. Cell*, 4214-24 (2005)
- 73) Válek V a kol., Maligní ložiskové procesy jater: diagnostika a léčba včetně minimálně invazivních metod, nakl. Grada, str. 20-21 (2006)
- 74) Wallace K et al, Liver fibrosis, *J. Biochem.*, 1–18 (2008)
- 75) Wang P et al, Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation, *J. Clin. Invest.*, 58–64 (2004)
- 76) Wang P et al, Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation, *J. Clin. Invest.*, 58–64 (2004)
- 77) Wells RG, Function and metabolism of collagen and other extracellular matrix proteins, *J. Clin.Gastroenterol.*, 158 -161 (2005)
- 78) Wells RG, Function and metabolism of collagen and other extracellular matrix proteins, *J. Clin.Gastroenterol.*, 158 -161 (2005)

- 79) Wilhelm SM et al Primary structure and function of stromelysin/transin in cartilage matrix turnover. Matrix Supplement 1, 37-44 (1992).
- 80) Wilhelm SM et al Primary structure and function of stromelysin/transin in cartilage matrix turnover. Matrix Supplement 1, 37-44 (1992).
- 81) Williams R. (2006) Global challenges in liver disease. J.Hepatol., 521–526
- 82) Woessner JF, Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, The FASEB J, 2145-2154 (1991)
- 83) Yoshiji H et al, Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases, Curr. Med. Chem., 2749-54.
- 84) Yuan JV et al, Two Novel Antifibrotics, HOE 077 and Safironil, J. Gastroenterol. 2011
- 85) Jiroutová A, Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů, Disertační práce, Lékařská fakulta UK, Hradec Králové (2011)