

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Exprese genů v jaterních myofibroblastech kultivovaných
v trojrozměrných gelech**

Bc. Lucie Podmolíková

Diplomová práce

2012

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**Gene expression in liver myofibroblasts cultured
in three-dimensional gels**

Bc. Lucie Podmolíková

Thesis

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Podmolíková**
Osobní číslo: **C10930**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Expres genů v jaterních myofibroblastech kultivovaných v trojrozměrných gelech**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

- 1) Teoretická část:
 - a) Úloha myofibroblastů při vzniku a rozvoji jaterní cirhózy
 - b) Vliv trojrozměrného prostředí (extracelulární matrix) na chování buněk
 - c) Charakter látky Wy 14643 a její působení na fibrotická játra
- 2) Praktická část:
 - a) Příprava gelů a kultivace myofibroblastů
 - b) Izolace RNA a proteinů
 - c) Analýza RNA s použitím kvantitativní RT-rtPCR
 - d) Analýza bílkovin westernovým přenosem

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25. 04. 2012

Lucie Podmolíková

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. a odbornému konzultantovi doc. RNDr. Jiřímu Kantovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce, trpělivost a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Mé poděkování patří také Mgr. Evě Peterové za ochotu a pomoc při práci v laboratoři, dále laborantkám Mileně Hajzlerové, Petře Kazimírové a ostatním členům laboratoře Ústavu lékařské biochemie za vytvoření příjemného prostředí pro experimentální práci.

Zvlášť bych chtěla poděkovat mé rodině za veškerou podporu, kterou mi poskytovala v průběhu celého studia.

SOUHRN

K fibróze dochází v chronicky poškozených játrech v důsledku aktivace hvězdovitých buněk (HSC) a portálních myofibroblastů (MFB). V poškozených játrech se hromadí proteiny extracelulární matrix, například fibrin a kolagen typu I. Funkce jaterního parenchymu je narušena. V naší práci jsme studovali expresi genů v jaterních MFB potkanů. Cílem bylo zjistit, jaký vliv má syntetická látka Wy-14643, jež je ligandem jaderného receptoru aktivovaného proliferátory peroxisomů (PPAR- α), na expresi genů jaterních MFB kultivovaných v trojrozměrném fibrinovém gelu a za standardních podmínek kultivace buněk na polystyrenových Petriho miskách.

MFB byly izolovány opakovaným pasážováním z frakce neparenchymových buněk potkanů, které byly získané po enzymatické perfuzi jater. MFB byly kultivovány v trojrozměrném fibrinovém gelu. Wy-14643 v koncentraci 100 μ M. bylo přidáno do kultivačního media na 12 h. Z buněk byla izolována celková RNA, podle níž byla syntetizována komplementární DNA (cDNA). Kvantitativní polymerasovou reakcí (RT-rt PCR) byla stanovena exprese mRNA. Výsledná data byla zpracována pomocí Studentova t-testu. Vliv Wy-14643 na expresi bílkovin jsme sledovali westernovým přenosem.

Studovali jsme expresi genu osteopontinu, matrixových metaloproteinů MMP-2 a MMP-9, transformující růstového faktoru TGF- β 1 a transkripčního faktoru PPAR- α . Tato práce ukázala, že ligand PPAR- α Wy-14643 ovlivňuje expresi genů v MFB kultivovaných ve fibrinovém nebo kolagenním gelu především na úrovni mRNA, zatímco vliv na expresi bílkovin byl velmi malý.

Klíčová slova: jaterní myofibroblasty, exprese genů, jaterní fibróza, Wy-14643

SUMMARY

Fibrosis of chronically damaged liver is a consequence of the activation of hepatic stellate cells (HSC) and of portal myofibroblasts (MFB). Proteins of the extracellular matrix (ECM), e.g. fibrin and collagen type I accumulate in damaged liver and the function of liver parenchyma is disturbed. We have studied gene expression in rat liver MFB. We studied the influence of the synthetic substance Wy-14643, the ligand of nuclear receptors PPAR- α , on the expression of the genes of liver MFB cultured in fibrin gel and under standard conditions in polystyrene Petri dishes.

MFB were isolated by repeated passaging of the fraction of nonparenchymal liver cells obtained after enzymatic liver perfusion. MFB were cultured in three-dimensional fibrin gel. Wy-14643 in the concentration of 100 μ M was added to the medium for 12 hours. Total cellular RNA was isolated and used for the synthesis of complementary DNA (cDNA). mRNA expression was determined using quantitative polymerase reaction RT-rt PCR and the data were evaluated by statistical t-test.

The expression of proteins was studied by western blotting. The genes whose expression was studied included osteopontin, metalloproteinases MMP-2 and MMP-8, transforming growth factor TGF- β 1 and transcription factor PPAR- α . We have found that Wy-14643 influences gene expression in MFB cultured in fibrin or collagen gel mostly on mRNA level, while the effect on protein expression was very small.

Key words: liver myofibroblasts, gene expression, liver fibrosis, Wy-14643

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BCA	kyselina bicinchoninová
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Ct	cycle threshold
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
ECM	extracelulární matrix
Fas	proapoptický Fas receptor
FBS	fetální telecí sérum
FGF	růstový faktor fibroblastů
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
GTC	guanidium isothiokyanát
HBSS	Hanksův sodný roztok
HBSS(-)	Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku
HGF	růstový faktor hepatocytů
HSC	jaterní hvězdicovité buňky
ICAM	intercelulární adhezivní molekula
IL-6	interleukin 6
MCD	deficit
MFB	myofibroblasty
MMP	matrixová metaloproteinasa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NF- κ B	jaderný receptor κ
NO	oxid dusnatý
OPN	osteopontin
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDGF	růstový faktor odvozený od destiček
PF	portální fibroblasty

PP	peroxisomové proliferátory
PPAR	receptory aktivované PP
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	reverzní transkriptasa
RT-rt PCR	kvantitativní PCR s reverzní transkripcí v reálném čase
RXR	retinoidní X receptor
SDS	dodecylsulfát sodný
TGF- β	transformující růstový faktor β
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteinás
TNF- α	tumory nekrotizující faktor α
VCAM	vaskulární intercelulární adhezivní molekula
Wy-14643	pirixinová kyselina
α -SMA	hladkosvalový α -aktin

OBSAH

	ÚVOD.....	1
1.	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1.1.	Játra.....	2
1.1.1.	Jaterní buňky	2
1.1.2.	Struktura jater.....	2
1.2.	Jaterní fibróza a cirhóza.....	4
1.2.1.	Jaterní fibróza.....	4
1.2.2.	Jaterní cirhóza	6
1.3.	Fibrogenní buňky.....	7
1.3.1.	Hvězdicovité buňky (HSC).....	7
1.3.2.	Portální fibroblasty (PF).....	11
1.4.	Extracelulární matrix (ECM).....	12
1.4.1.	Degradace ECM	13
1.5.	Wy-14643 a její receptory	15
1.5.1.	Jaderné receptory PPAR	15
1.5.2.	Wy-14643.....	17
2.	METODY	19
2.1.	Laboratorní potkani	19
2.2.	Perfuze jater.....	19
2.2.1.	Perfuzní roztoky	19
2.2.2.	Anestezie zvířete, laparotomie a kanylace <i>vena portae</i>	19
2.3.	Izolace jaterních HSC	20
2.4.	Kultivace HSC a MFB.....	21
2.4.1.	Postup kultivace	21
2.4.2.	Příprava Wy-14643	21
2.5.	Příprava gelů pro kultivaci buněk.....	21
2.5.1.	Izolace kolagenu z ocasních šlach potkana.....	21
2.5.2.	Příprava kolagenního gelu.....	22
2.5.3.	Příprava fibrinového gelu.....	22
2.6.	Sklízení buněk z gelů.....	22

2.6.1.	Kontrolní buňky na plastru	22
2.6.2.	Buňky v gelech.....	22
2.7.	Izolace RNA	23
2.7.1.	Izolace RNA fenol-chloroformovou metodou	23
2.7.2.	Přečištění RNA na kolonách Nucleospin® RNA XS	23
2.7.3.	Měření koncentrace RNA spektrofotometricky	24
2.7.4.	Kontrola kvality RNA gelovou elektroforézou.....	24
2.8.	Reverzní transkripce RNA	25
2.8.1.	Princip	25
2.8.2.	Postup.....	25
2.9.	Real time RT PCR (RT-rt PCR).....	26
2.9.1.	Princip	26
2.9.2.	Postup.....	29
2.9.3.	Stanovení kvantity genové exprese.....	30
2.10.	Příprava bílkovin pro westernový přenos.....	33
2.11.	Měření koncentrace bílkovin.....	33
2.12.	Westernový přenos	34
2.12.1.	Princip	34
2.12.2.	Postup.....	34
2.12.3.	Vyhodnocení	35
2.13.	Statistická analýza	35
2.14.	Chemikálie a přístroje.....	35
2.14.1.	Chemikálie	35
2.14.2.	Přístroje	38
2.14.3.	Nástroje a materiál	39
2.14.4.	Použitý software.....	39
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
3.1.	Vliv Wy-14643 na expresi genů jaterních MFB	40
3.2.	Vliv Wy-14643 na expresi bílkovin jaterních MFB.....	42
	DISKUSE.....	48
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53

ÚVOD

Jaterní cirhóza je onemocnění, které vzniká v důsledku chronického poškození jaterního parenchymu. Dochází k akumulaci nadměrného množství extracelulární matrix (ECM) v Disseho prostoru. Patologická ECM je tvořena několika typy kolagenu, glykoproteiny a proteoglykany. Nekrotická tkáň je nahrazena vazivem. Regenerací fibrotické tkáně dochází ke změně struktury jaterní tkáně a cévního zásobení. Vznikají vazivová septa a cirhotické uzly, a tím dochází k poruše funkce jaterní tkáně.

Jaterní tkáň je složena z řady typů buněk, z nichž se na fibróze nejvýznamněji podílí hvězdicovité buňky (HSC) a portální myofibroblasty (MFB). Při chronickém poškození jaterní tkáně se HSC aktivují a produkují patologickou ECM bohatou na kolagen typu I a III. Portální MFB jsou buňky, které exprimují hladkosvalový α -aktin (α -SMA).

Cílem této práce bylo sledování vlivu kyseliny pirixinové (Wy-14643), která se váže na jaderné receptory α -PPAR, na expresi genů v MFB izolovaných z potkaních jater. Srovnávali jsme také vliv různého kultivačního prostředí, zejména trojrozměrného fibrinového gelu, kolagenního gelu a klasické kultivace na plastových Petriho miskách.

Navázali jsme na diplomové práce Mgr. Petry Čevelové „Expresí genů v jaterních fibroblastech kultivovaných v trojrozměrné matrix“, Mgr. Jana Šafky „Působení potenciálních léčiv na expresi genů v jaterních myofibroblastech“ a na disertační práci Mgr. Aleny Jiroutové, Ph.D. „Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů“. Naše práce rozšiřuje předchozí experimenty a zaměřuje se na vliv působení Wy-14643 na jaterní MFB kultivované ve fibrinovém gelu.

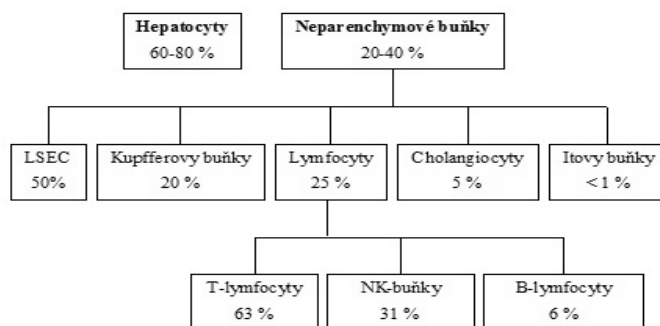
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Játra

Játra jsou největší vnitřní orgán těla, mezi jehož nejdůležitější funkce patří enzymatické zpracování cukrů, tuků a bílkovin. Játra jsou zodpovědná za detoxikaci xenobiotik a nakládání se žlučovými barvivy. Mezi další funkce patří shromažďování glykogenu, tuků a vitamínu A (Paulsen, 2004). V případě ztráty části parenchymu mají játra vysokou schopnost regenerace (Wallace et al., 2008).

1.1.1. Jaterní buňky

Jaterní tkáň je složena z parenchymových a neparenchymových buněk. Mezi parenchymové buňky se řadí hepatocyty, které představují většinu celkové buněčné populace v játrech. Mezi neparenchymové buňky patří Kupfferovy buňky, endotelové buňky, hvězdčité buňky (HSC), epitelové buňky žlučových cest, portální fibroblasty (PF), oválné buňky, NK buňky, vaskulární a lymfatické endotelové buňky (Wallace et al., 2008).

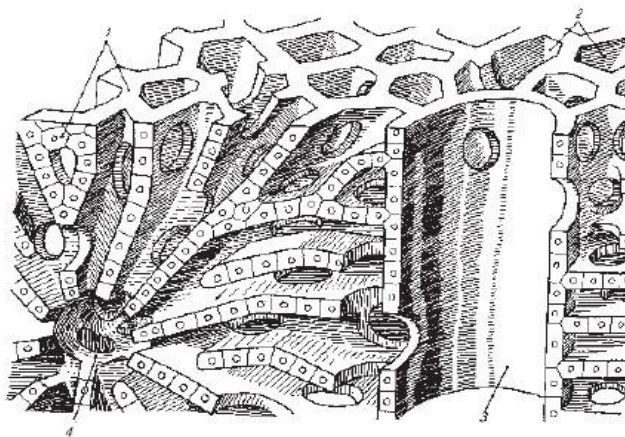


Obr. č. 1: Zastoupení buněk v jaterní tkáni
(zdroj: upraveno dle Ehrmann, Hůlek, 2010)

1.1.2. Struktura jater

Základní jaterní strukturou je jaterní lalůček, tzv. lobulus. Jedná se o cylindrickou strukturu o délce několika milimetrů a průměru 0,8-2 mm. Jaterní lalůček se nachází kolem *vena centralis*. Skládá se z mnoha hepatocelulárních trámců, které jsou uspořádány odstředivě od *vena centralis*. Každý trámec je tvořen jednou nebo

dvěma vrstvami hepatocytů (Ehrmann, Hůlek, 2010). Tyto trámce jsou odděleny jaterními sinusoidami, které slouží jako krevní kapiláry. Sinusoidy se sbíhají do středů jaterního lalůčku a vtékají přímo do *vena centralis* (Paulsen, 2004). Každý hepatocyt je v kontaktu s krví sinusu (Trojan, 2003). Mezi sinusoidními endotelovými buňkami a hepatocyty je subendotelová štěrbina, tzv. Disseho prostor, který obsahuje nízkou hustotu proteinové ECM a HSC (Junqueira et al., 1997; Friedmann, 2003). Krev je do jater přiváděna pomocí *vena portae* a *arteria hepatica*. Jaterní vény, lymfatické cévy a žlučové vývody patří mezi systémy, které odvádějí látky z jaterní tkáně. V řezu vypadají jaterní lalůčky jako šestiúhelníky, které leží těsně vedle sebe. Na každém ze šesti rohů lalůčku je portální triáda, která zahrnuje větev *vena portae*, *arteriae hepaticae* a přítok žlučového vývodu (Paulsen, 2004).

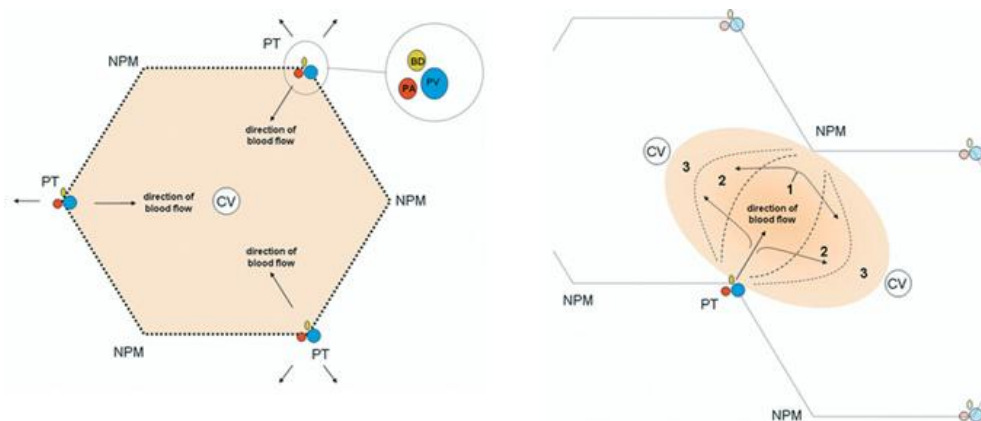


Obr. č. 2: Mikroanatomie jaterní tkáně (zdroj: Poli, 2000)

1-vrstva hepatocytů, 2-sinusoidy, 3-jaterní prostor, 4-*vena centralis*

Jako základní strukturu jater lze definovat i portální lalůček, který má na rozdíl od jaterního lalůčku tvar trojúhelníku a se nachází kolem portální triády (Ehrmann, Hůlek, 2010; Junqueira et al., 1997). Z hepatocytů je žluč odváděna pomocí terminálního žlučovodu. Portální lalůček je ohraničen dvěma nebo více *vena centralis* (Ehrmann, Hůlek, 2010).

Dalším modelem struktury jater je jaterní acinus, který má tvar kosočtverce. Obsahuje jednu osu tvořící linii mezi dvěma portálními triádami a druhou, která tvoří spojnici mezi dvěma centrálními žilami (Ehrmann, Hůlek, 2010). Tato struktura se využívá v histopatologii k vysvětlení patologických lézí (Wallace et al., 2008).



Obr. č. 3: Jaterní lalůček a jaterní acinus (zdroj: Wallace et al., 2008)

CV-*vena centralis*, NPM-uzlový centrální bod, PT-portální prostor,
BD-žlučovod, PA-periportální arteriola, PV-periportální venula

1.2. Jaterní fibróza a cirhóza

1.2.1. Jaterní fibróza

Jaterní fibróza je hojivý proces vyvolaný chronickým poškozením jater. Aktivace reparačních mechanismů vede k nadměrnému ukládání ECM v Disseho prostoru a k náhradě hepatocytů nefunkčním vazivem (Desmoulière et al., 2003; Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Zhoršuje se regenerace tkání, dochází k produkci prozánětlivých cytokinů a infiltraci zánětu (Seth et al., 2010). Dochází ke zvýšení množství zánětlivých buněk a k aktivaci buněk, které produkují kolagen. Mezi ně patří hlavně HSC, portální fibroblasty (PF) a jaterní myofibroblasty (MFB) (Bataller, Brenner, 2005). Mění se složení ECM, původní nízká hustota intersticiálního vláknitého kolagenu se zvyšuje, což vede k fibrinogenezi (Seth et al., 2010). Jedná se především o vláknitý kolagen typu I a III, jehož hladina se zvýší až 8 x, ale i další extracelulární složky, jako jsou fibronectin, undulin, elastin, hyaluronan, laminin a proteoglykany (Barascuk et al., 2010; Bataller, Brenner, 2005).

Ve zdravé jaterní tkáni je fibrogenese a fibrinolýza v rovnováze. Při poškození hepatocytů dochází k poruše této rovnováhy a zvyšuje se tvorba vaziva, čímž dochází k jizvení tkáně (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003; Wallace et al., 2008). Jedná se o nerovnováhu mezi metaloproteinasami, především kolagenasou, želatinasami

a elastasou, a jejich endogenními inhibitory TIMP (Desmoulière et al., 2003) Jaterní parenchym je pak nahrazen tkání bohatou na kolagen (Bataller, Brenner, 2005).

Mezi hlavní příčiny jaterní fibrózy se řadí chronická virová hepatitida, zejména typu B a C. Dále pak autoimunitní onemocnění, onemocnění žlučových cest, metabolická onemocnění jako jsou hemochromatóza, Wilsonova choroba a nealkoholická steatohepatitida (NASH). Mezi nejčastější chemické příčiny patří nadměrné užívání alkoholu (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003; Wallace et al., 2008). Rozvoj jaterní fibrózy ovlivňují nejen genetické faktory, ale i faktory životního prostředí, např. obezita a kouření (Bataller, Brenner, 2005; Corpechot et al., 2012).

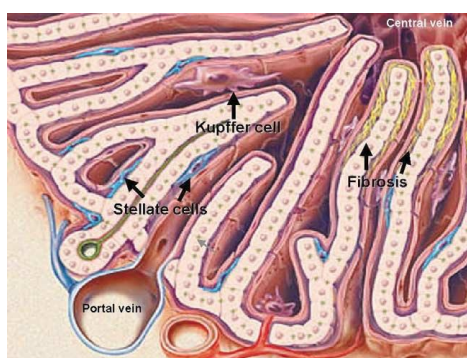
Poškození jater vede k zánětlivé reakci a nahromadění leukocytů v místě zánětu. Pomocí adhezivních molekul z rodiny selektinů, a jejich ligandů dochází k adhezi leukocytů na stěny endotelu. Tím je zajištěna pohyblivost ve směru toku krve. Receptory jsou zodpovědné za rolling fenomén, důležitý pro další adhezi a migraci leukocytů. V místě poškození jsou produkovány chemoatraktanty, které v reakci s leukocyty aktivují integrinové receptory a dochází ke zlepšení přilnavosti. Zánětlivý infiltrát může obsahovat T a B-lymfocyty, plasmatické buňky, histiocyty, eozinofily, neutrofilů, NK a žírné buňky (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003).

Leukocyty v místě poškození jater mohou spolu s Kupfferovými buňkami hromadit a ovlivňovat chování HSC. Monocyty a makrofágy produkují NO a zánětlivé cytokiny, zejména tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulující HSC. Kupfferovy buňky produkují reaktivní formy kyslíku (ROS), cytokiny, zejména TGF- β 1, čímž stimulují syntézu ECM, buněčnou proliferaci a uvolnění retinoidů z HSC (Bataller, Brenner, 2005; Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Dále Kupfferovy buňky exprimují TNF- α , který ovlivňuje apoptózu. Apoptóza podporuje zánět a fibrózu, dochází k produkci TGF- β 1 a dalších fibrogenických cytokinů. Pohlcení apoptických buněk makrofágy vede k aktivaci buněk produkujících kolagen (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003).

Akutní poškození jater vede k nekróze a apoptóze poškozených hepatocytů. Fibroblasty také podstupují procesu apoptózy a Kupfferovy buňky vylučují faktory, které pomocí MMP přetvářejí ECM. Výsledkem je, že sinusová struktura jater se vrací k normálu. Proces fibrózy je v tomto případě reverzibilní (Wallace et al., 2008).

Chronické poškození jater vede ke zvýšení fibroblastů a rozvoji fibrózy. Dochází k postupnému jizvení jaterní tkáně, hepatocyty se nemohou regenerovat a může dojít k poruše funkce orgánu (Wallace et al., 2008).

Hepatocyty jsou oproti jiným buňkám citlivější na toxická činidla včetně alkoholu, žlučových kyselin a jsou náchylnější na virové infekce. V reakci na nevratné poškození dochází k aktivaci programované buněčné smrti. Vlivem apoptózy hepatocytů se zvyšuje sekrece profibrogenických a prozánětlivých cytokinů, jako jsou TGF- β 1 a TNF- α . Tím dochází k aktivaci HSC a dalších buněk produkujících kolagen (Kisseleva, Brenner, 2007).



Obr. č. 4: Sinusoidní struktura, umístění jaterních buněk a vznik fibrózy
(zdroj: Friedmann, 2003)

1.2.2. Jaterní cirhóza

Jaterní cirhóza je proces, který se projevuje difuzním zánětem jaterního parenchymu. Dochází k nekróze hepatocytů a zmnožení vaziva (Ehrmann, Hůlek, 2010). Regenerací fibrotické tkáně dochází k narušení jaterní architektury a struktury cév (Wallace et al., 2008). Zanikají jaterní lalůčky a mezi hepatocyty vznikají difuzní vazivová septa (Ehrmann, Hůlek, 2010). To má za následek přestavbu jaterního parenchymu na nodulární architekturu, kdy jsou přítomny cirhotické uzly. Změna cévní struktury vede k rozvoji portální hypertenze a poruše normální funkce jaterní tkáně (Wallace et al., 2008).

Jaterní cirhóza je onemocnění označované jako poslední stádium fibrózy (Příbramská, Husová, 2007). Na rozdíl od jaterní fibrózy byla cirhóza dříve považována za ireverzibilní proces i po odstranění škodlivého agens (Iredale et al., 1998). Podle

novějších studií se dnes jaterní cirhóza považuje za reverzibilní proces (Friedman, 2003).

Rozlišujeme dva druhy jaterní fibrózy, a to portální a perisinusoidální. U portální cirhózy dochází k výrazné poruše architektonické struktury jaterní tkáně, kdežto perisinusoidální cirhóza vede ke kapilarizaci sinusoid (Calès, 1998).

Dále cirhózu dělíme podle morfologie velikosti uzlů v jaterním parenchymu na mikronodulární, makronodulární a smíšenou. Mikronodulární cirhóza je charakterizována uzly menšími než 3 mm, které jsou obklopeny fibrotickou tkání a ve většině případů u nich chybí centrální žíla i portální prostor. Makronodulární cirhóza je charakterizována uzly různé velikosti od 3 mm, kdy uzly obsahují centrální žílu i portální prostor. Smíšená cirhóza je kombinací obou předchozích typů (Ehrmann, Hůlek, 2010).

1.3. Fibrogenní buňky

Mezi hlavní buňky produkující kolagen, v případě poškození jaterních buněk, patří aktivované HSC, PF a MFB pocházející z kostní dřeně. Tyto buňky k aktivaci vyžadují fibrogenické cytokiny, jako např. TGF- β 1, angiotensin II a leptin (Bataller, Brenner, 2005).

1.3.1. Hvězdicovité buňky (HSC)

1.3.1.1. Klidové HSC

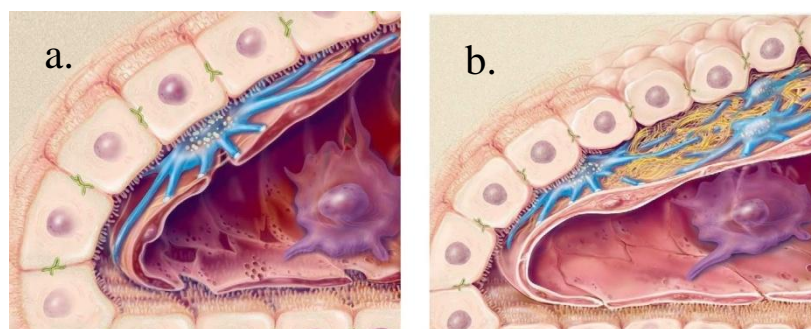
HSC, dříve nazývané také Itovy buňky, buňky skladující tuky, lipocyty, mají vřetenovité tělo s dlouhými cytoplasmatickými výběžky a oválným jádrem (Jiroutová et al., 2011). HSC patří mezi neparenchymové buňky. Nachází v Disseho prostoru, kde jsou v úzkém kontaktu s hepatocyty a sinusoidními endoteliálními buňkami (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003; Poli, 2000). Jsou umístěny v centrilobulární a perisinusoidální oblasti jaterního lalůčku. Poškození centrilobulární části vede k aktivaci HSC (Wallace et al., 2008).

Ve zdravých játrech slouží HSC k ukládání vitamínu A ve formě cytoplasmatických tukových kapének (Desmoulière, 2007). Tyto buňky obsahují

největší množství vitamínu A v těle (Desmoulière et al., 2003). Klidové HSC mají sníženou schopnost proliferace, fibrogeneze a nemají schopnost kontraktility (Bedossa, Paradis, 2003).

HSC jsou důležité pro regulaci sinusoidního průtoku krve a tonu v jaterní tkáni. HSC upravují expresi komponent ECM pomocí MMP a jejich tkáňových inhibitorů TIMP. Paralelně s aktivací HSC dochází ke spouštění apoptózy. HSC mohou zpracovávat antigeny, a to jak zprostředkovanou endocytózou, tak pomocí fagocytózy (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003).

Klidové HSC syntetizují růstový faktor hepatocytů (HGF) a jen malé množství proteinů ECM (Bedossa, Paradis, 2003; Iredale et al., 1998). HSC exprimují markery spojené s nervovou tkání jako např. synatophysin, nestin, reelin, neurotrophin a gliální fibrilární kyselý protein (GFAP) (Bataller, Brenner, 2005; Bedossa, Paradis, 2003).



Obr. č. 5: Subendoteliální změny a aktivace HSC při poškození jater
(zdroj: Friedmann, 2003)

- a. Normální sinusoidní architektura. Klidové HSC (modré) obsahují kapičky vitamínu A.
- b. Patologická tkáň. Aktivované HSC jsou obklopeny vláknitou ECM.

1.3.1.2. Aktivované HSC

V reakci na chronické poškození jater dochází k aktivaci HSC, při níž se tyto buňky množí a transformují na fenotyp MFB. Dochází k funkčním a morfológickým změnám. V cytoplasmě HSC se rozvíjí myofilamenta, tyto buňky ztrácejí tukové kapénky s obsahem vitamínu A a tento obsah je uvolněn do extracelulárního prostoru

(Desmoulière, 2007; Bedossa, Paradis, 2003; Tsudaka et al., 2006). Zvyšuje se proliferace buněk, motilita, kontraktilita, mění se složení a struktura složek ECM (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Kontraktilita buněk je zajištěna pomocí endotelinu-1, což je antagonist NO (Tsudaka et al., 2006).

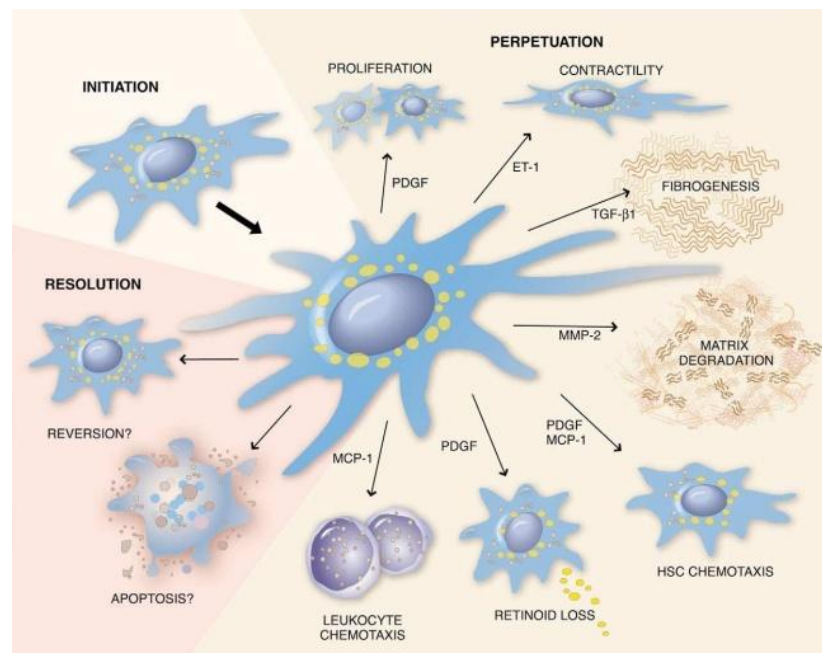
V aktivním fenotypu dochází nejen k nárůstu počtu HSC, ale i k jejich zvýšené syntéze a sekrece ECM. HSC regulují degradaci ECM pomocí přirozených tkáňových inhibitorů metaloproteinasy-1 (TIMP-1) (Bataller, Brenner, 2005; Hannivort et al., 2012). Pro aktivované HSC je typická zvyšující se exprese α -SMA, což je charakteristické pro tvorbu vazivové jizvy (Baroni et al., 1996; Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Dále se zvyšuje exprese prokolagenu a kolagenu, především typu I a III. Aktivované HSC ovlivňují sinusoidní strukturu. Kapilarizované sinusoidy jsou charakterizovány nahromaděním ECM v Disseho prostoru, čímž dochází ke zhoršení metabolické výměny mezi krví a hepatocyty. To je příčinou portální hypertenze a zánikem jaterního parenchymu. Aktivované HSC mohou pomocí endocytózy zpracovávat exogenní antigeny, a to nízko- a vysokomolekulární látky, např. dextran a transferin (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003).

Aktivované HSC vylučují profibrogenní cytokiny, chemokiny, růstové faktory jako např. TGF- β 1, růstový faktor fibroblastů (FGF), růstový faktor odvozený od krevních destiček (PDGF), adhezivní molekuly jako jsou integriny, VCAM-1, ICAM-1 a také ROS (Kisseleva, Brenner, 2007; Poli, 2000; Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Tyto látky jsou secernovány poškozenými hepatocyty, Kupfferovými a zánětlivými buňkami (Kisseleva, Brenner, 2007). TGF- β 1 a IL-6 patří mezi hlavní profibrogenní cytokiny (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Na rozdíl od klidových HSC aktivované HSC neexprimují GFAP (Jiroutová et al., 2007).

Jeden z nejdůležitějších mediátorů jaterní fibrózy je růstový faktor TGF- β , který je produkován Kupfferovými buňkami. Ze tří izoform TGF- β je pouze TGF- β 1 zapojen do fibrogenese. Zprostředkovává kontakt mezi parenchymovými, zánětlivými a buňkami produkujícími kolagen. TGF- β 1 spouští apoptózu hepatocytů, indukuje aktivaci a shlukování buněk do místa zánětu a diferenciaci jaterních buněk. Aktivuje HSC, stimuluje syntézu ECM a potlačuje degradaci ECM (Kisseleva, Brenner, 2007). Dále TGF- β 1 indukuje expresi TIMP-1, což je tkáňový inhibitor MMP-1, který se účastní kolagenní degradace. TGF- β 1 ovlivňuje růst, diferenciaci, proliferaci, apoptózu

a migraci buněk (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). Na aktivaci HSC se podílí i růstový faktor (PDGF), který se odvozen od krevních destiček a je hlavním mitogenem pro HSC (Kisseleva, Brenner, 2007). Endotelin-1 je látka, která ovlivňuje kontraktilitu HSC (Tsudaka et al., 2006).

Naopak, mediátor interferon- γ (INF- γ) inhibuje aktivaci HSC, čímž přispívá ke snížení syntézy a ukládání kolagenu, lamininu a ke snížené expresi α -SMA. Pomocí tohoto regulačního mediátoru se snižuje i množství ECM (Baroni et al., 1996).



Obr. č. 6: Aktivace a funkce HSC v případě jaterního poškození
(zdroj: Friedman, 2003)

1.3.1.3. Zánik HSC

Hlavním regulačním mechanismem zániku aktivovaných HSC je apoptóza (Iredale et al., 1998). Po procesu regenerace jaterní tkáně mohou HSC iniciovat apoptózu prostřednictvím Fas (Calès, 1998). Programovaná buněčná smrt je zprostředkována vazbou ligandu Fas (FasL) s receptorem Fas. Aktivované HSC a ECM podporují apoptózu (Tsudaka et al., 2006). Následkem ztráty HSC se sníží exprese α -SMA, TIMP-1, TIMP-2, sekrece kolagenu I a proliferace (Iredale et al., 1998). V opačném případě inhibice apoptózy vede k aktivaci a proliferaci HSC (Calès, 1998).

1.3.2. Portální fibroblasty (PF)

PF jsou mediátory fibrózy, které mají významný vliv na regeneraci tkáně produkcí kolagenu a elastinu. Stejně jako HSC patří i PF mezi neparenchymové buňky jater. Jsou umístěné v těsné blízkosti epitelu žlučových cest, a proto jsou významné především v biliární fibróze.

PF se vyznačují nápadným endoplazmatickým retikulem, zatímco jejich Golgiho komplexy jsou poměrně malé. Portální fibroblasty se podobají ostatním fibroblastům expresí elastinu.

Jak už bylo zmíněno, PF patří mezi hlavní buňky exprimující elastin. Se zmnožením PF se zvyšuje množství elastinu a dochází k rozvoji fibrózy. Elastin zajišťuje odolnost, naproti tomu kolagen poskytuje tuhost, jež je charakteristická pro jizvení jaterní tkáně (Dranoff, Wells, 2010).

PF produkují bílkoviny ECM. Zúčastňují se procesu regenerace tkáně tím, že exprimují řadu cytokinů a chemokinů. PF jsou aktivovány produkty Kupfferových buněk, jako jsou cytokiny a reaktivní formy kyslíku (Wallace et al., 2008).

Při chronickém poškození jater podléhají PF diferenciaci, kdy získávají fenotyp MFB. K této diferenciaci je nutný růstový faktor TGF- β 1. Dosud byly identifikovány 3 typy MFB, a to MFB odvozené od HSC, portální a septální MFB. Na rozdíl od MFB odvozených od HSC portální MFB mohou mít různou velikost (Dranoff, Wells, 2010).

Po diferenciaci PF, stejně jako klasické MFB, exprimují α -SMA, který je hlavní složkou matrix v procesu hojení ran. Jedná se o svazky mikrovláken, které jsou uspořádány paralelně k ose buňky. Všechny α -SMA aktivují HSC. Pro buněčnou komunikaci mezi PF a epitelem žlučových cest jsou důležité cytokiny a chemokiny, především interleukin-6 (IL-6) a chemotaktický protein leukocytů MCP-1. Aktivované MFB exprimují kolagen typu I, růstový faktor TGF- β , především izoformu TGF- β 2, dále PGDF, endotelin-1. Naopak se snižuje exprese prozánětlivého cytokinu IL-6.

Mezi specifické markery jaterních fibroblastů patří fibulin-2, IL-6 a elastin. Jaterní MFB se od HSC liší expresí P100, α -2 makroglobulinu a absencí tukových kapének (Dranoff, Wells, 2010). Na rozdíl od HSC MFB nevyjadřují FasL, tudíž se nemohou vázat na apoptický receptor Fas a spustit tak programovanou buněčnou smrt (Tsudaka et al., 2006).

1.4. Extracelulární matrix (ECM)

Extracelulární matrix (ECM) tvoří molekulární síť a tento substrát představuje strukturální oporu pro mobilní složky. ECM umožňuje transport rozpuštěných látek a růstových faktorů (Friedman, 2003). Prostřednictvím receptorů, zejména integrinů působí jako zdroj signálů, které ovlivňují růst, morfologii a diferenciaci buněk přítomných v jaterní tkáni (Burrige, 1992; Desmoulière et al., 2003). Integriny patří mezi transmembránové adhezivní receptory a zajišťují spojení mezi ECM a cytoskeletem. Váží se na složky ECM, jako jsou fibronectin, vitronectin a různé typy kolagenu (Geiger et al., 2001). K adhezi buněk a následné interakci mezi buňkami slouží i elastický protein ECM tenascin (Oberhauser et al., 1998).

Za normálních okolností má ECM nízkou hustotu a tvoří jej především kolagen typu IV, laminin a entaktin-nidogen (Bedossa, Paradis, 2003). V případě poškození jater se složení ECM mění, zvyšuje se hustota vláknitého kolagenu a dochází k jizvení (Friedman, 2003). Tyto kvantitativní i kvalitativní změny ve složení ECM ovlivňují jaterní funkce. Bílkoviny tvořící ECM rozdělujeme na kolagenní a nekolagenní složky (Bedossa, Paradis, 2003). Z kolagenních složek je v normálních játrech ECM tvořena kolageny typu I, III, IV, V, VI, XIV, a XVIII. Ve fibrotické tkáni nejvíce zastoupen kolagen typu I, III, IV. Dosud bylo identifikováno 27 typů kolagenu (Tsudaka et al., 2006). Do nekolagenních složek ECM řadíme glykoproteiny a proteoglykany. Laminin, fibronectin, tenascin a nidogen jsou součástí glykoproteinové složky ECM, zatímco heparansulfát, dermatansulfát, chondroitin sulfát, kyselina hyaluronová, biglykan a dekorin patří mezi proteoglykany (Bedossa, Paradis, 2003).

Mezi největší producenty ECM patří HSC a portální MFB (Jiroutová et al., 2007). Na zvýšení syntézy ECM se podílejí růstové faktory a enzymy (lysyl oxidasa, prolyl hydroxylasa, lysyl hydroxylasa). Zvyšují především produkci kolagenu typu I a III (Desmoulière et al., 2003; Friedman, 2003). Transformující růstový faktor TGF- β 1 se podílí na syntéze ECM a zároveň inhibuje její degradaci (Dooley et al., 2001).

1.4.1. Degradace ECM

K odbourávání nadbytečné ECM dochází z důvodu obnovy normální architektury jater (Friedman, 2003). K remodelaci ECM jsou potřebné extracelulární proteolytické enzymy (Brenner et al., 1989). Odbourávání ECM je popsáno dvěma způsoby. Prvním případem je rozklad, který narušuje nízká hustota ECM ve zdravých játrech, ve druhém případě jde o odbourávání jizvy v případě poškozené jaterní tkáně, což vede k obnově normální architektury jater (Friedman, 2003).

1.4.1.1. Matrixové metaloproteinasy (MMP)

Matrixové metaloproteinasy (MMP), také nazývané matrixiny, jsou zinek-dependentní enzymy, které se účastní degradace ECM a mění biologické funkce makromolekul ECM specifickou proteolysou (Nagase, Woessner, 1999). MMP jsou produkovány aktivovanými HSC (Bedossa, Paradis, 2003). Největší množství MMP je v játrech v případě akutního poškození, ve fibrotických játrech se množství snižuje, a proto dochází k akumulaci ECM. Tyto endopeptidasy jsou vyjádřeny v embryonálním vývoji a zůstávají v aktivně rostoucích tkáních. V těchto tkáních se nachází v klidovém stavu a v případě poškození se aktivují (Qin, Han, 2010).

Všechny MMP jsou syntetizovány jako prepro-enzymy (Nagase, Woessner, 1999). Ve většině případů, kromě MMP membránového typu, jsou vylučovány ve formě pro-MMP (Nagase, Woessner, 1999; Zítka et al., 2009). Tyto neaktivní prekurzory enzymu, tzv. zymogeny, vyžadují aktivaci, přičemž ztratí asi 10 kDa (Nagase, Woessner, 1999; Woessner, 1991). Latence je udržována v důsledku vazby cysteinu na atom zinku. Neaktivní MMP mohou být aktivovány proteolytickým štěpením, kdy proteasa odštěpí peptid obsahující uvedený cystein nebo aktivující činidlo reaguje s cysteinem (Woessner, 1991). V případě aktivace *in vitro* se mohou použít proteasy, nebo neproteolytické látky, jako např. látky s reaktivní -SH skupinou, rtuťové sloučeniny, reaktivní kyslík a denaturační činidla. Při aktivaci *in vivo* se využívají tkáňové, plasmové nebo oportunní bakteriální proteinasy (Nagase, Woessner, 1999).

MMP degradují kolagenní a nekolagenní substráty. Tyto enzymy rozdělujeme podle substrátové specifity do 5-ti skupin dle tabulky č. 1.

Tab. č. 1: Rozdělení MMP dle substrátové specifity (zdroj: Friedman, 2003).

Skupina MMP	
intersticiální kolagenasy	MMP-1, MMP-8, MMP-13
želatinasy	MMP-2, MMP-9
stromelysiny	MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11
membránového typu	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25
metaloelastasy	MMP-12

Tab. č. 2: Jednotlivé typy MMP (zdroj: Nagase, Woessner, 1999)

MMP	
kolagenasa 1	MMP-1
želatinasa A	MMP-2
stromelysin 1	MMP-3
matrilysin	MMP-7
kolagenasa 2	MMP-8
želatinasa B	MMP-9
stromelysin 2	MMP-10
stromelysin 3	MMP-11
makrofágová elastasa	MMP-12
kolagelasa 3	MMP-13
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT4-MMP	MMP-17
kolagenasa 4	MMP-18
není triviální název	MMP-19
enamelysin	MMP-20
XMMP	MMP-21
CMMP	MMP-22
není triviální název	MMP-23

Kolagenasy jsou enzymy, degradují kolagen typu I, II, III, VIII a X. Stromelysiny odbourávají fibronectin, proteoglykany, kolagen typu IV a laminin. Želatinasy odbourávají denaturovaný kolagen a kolagen typu IV (Brenner et al., 1989).

MMP-2 a MMP-9 rozkládají kolagen typu IV, MMP-1 a MMP-2 membránového typu aktivují latentní MMP-2 a stromelysin-1, který odbourává proteoglykany a glykoproteiny. MMP-1 štěpí vláknitý kolagen typu I, převládající ve fibrotických játrech. Pokud se jizva neodbourá, fibróza postupuje a dochází k rozvoji cirhózy v jaterní tkáni (Friedman, 2003).

Expresi MMP je transkripčně regulována růstovými faktory, hormony, cytokiny, buněčnou transformací a některými chemickými látkami (Nagase, Woessner, 1999). Např. prozánětlivý cytokin TNF- α zvyšuje expresi MMP, čímž napomáhá degradaci kolagenu (Tsudaka et al., 2006). Naopak transformující růstový faktor TGF- β 1 zvyšuje expresi fibronektinu a kolagenu (Ignatz, Massagué, 1985).

Proteolytická aktivita MMP je kontrolována, resp. snižována pomocí endogenních inhibitorů, α -makroglobulinů a tkáňových inhibitorů (TIMP). TIMP regulují nejen množství ECM, ale i biologickou aktivitu (Nagase, Woessner, 1999). Hlavním zdrojem těchto inhibitorů jsou HSC (Friedman, 2003). Jsou známy 4 homologní typy (TIMP-1 až TIMP-4). TIMP-1 a TIMP-2 mají mitogenní účinek, TIMP-2 dále inhibuje růstový faktor fibroblastů (FGF), jež ovlivňuje růst endoteliálních buněk (Nagase, Woessner, 1999).

1.5. Wy-14643 a její receptory

1.5.1. Jaderné receptory PPAR

PPAR jsou hormonální jaderné receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PP). Vazbou se specifickými přírodními nebo syntetickými ligandy dojde k aktivaci, vytvoří se heterodimer s receptorem 9-cis retinové kyseliny (RXR). Vznikne komplex, který se váže na specifické responzivní elementy PP v regulačních oblastech cílových genů (Gizard et al., 2005; Lamotte et al., 2010). Následkem této vazby dochází ke změně transkripční aktivity PPAR a regulaci exprese mnoha genů (Sporn et al., 2001). Mezi přirozeně se vyskytující PP patří steroidy, mastné kyseliny, eikosanoidy a prostaglandiny. Do syntetických PP řadíme hypolipidemické drogy, změkčovadla

a průmyslová rozpouštědla (Fan et al., 2003; Marx, 1999). Tyto chemikálie vedou u hlodavců k hepatomegalii, tvorbě jaterních nádorů, buněčné proliferaci a ovlivňují metabolismus lipidů (Corton et al., 1998; Schen et al., 2011).

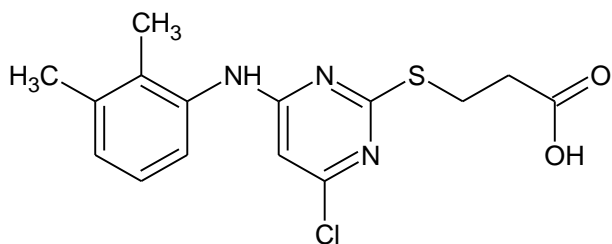
Rodina jaderných receptorů PPAR obsahuje tři podtypy: PPAR- α , - β , - δ , které nejen regulují metabolické funkce, ale ovlivňují i buněčné procesy včetně proliferace, diferenciací a apoptózy (Gelman et al., 2007). Receptory PPAR regulují aktivaci HSC (Bataller, Brenner, 2005).

PPAR- α jsou z těchto izoform nejvýznamnější pro farmaceutický vývoj (Peréz-Fernandéz et al., 2011). Jsou exprimovány především v tkáních, které se zúčastňují metabolismu lipidů, zejména v játrech, dále ve střevech, srdci a ledvinách (Fan et al., 2003). Studie na lidských játrech plodu prokázala, že exprese PPAR- α a PPAR- γ se zvyšuje s věkem plodu, zatímco exprese PPAR- γ zůstala v tomto případě konstantní (Abbot et al., 2010). PPAR- α jsou důležité pro regulaci buněčného příjmu, metabolismus lipoproteinů aktivací a β -oxidací mastných kyselin (Thieme et al., 2010). Aktivace PPAR- α jejich ligandy snižuje hladinu triglyceridů a zároveň zvyšuje hladinu HDL cholesterolu v krvi. Působení PP v jaterní tkáni závisí zejména na expresi PPAR- α (Raval et al., 2011). Tento transkripční faktor zvyšuje expresi genů, čímž umožňuje vychytávání mastných kyselin (Ip et al., 2004). Receptory PPAR- α jsou aktivovány endogenními i exogenními látkami, včetně polynenasycených mastných kyselin a prostaglandinů (Raval et al., 2011). Glukokortikoidy zvyšují expresi PPAR- α (Poole et al., 2001).

PPAR- β , také známý pod pojmem PPAR- δ , je exprimován všeobecně a jeho funkce nejsou dosud jasné. Další z podtypů, PPAR- γ , je vyjádřen v tukové tkáni, kde se účastní adipogeneze (Fan et al., 2003). PPAR- γ reguluje hladinu glukosy tím, že zvyšuje citlivost na inzulín pomocí regulace β -buněk pankreatu (Brown et al., 2010; Thieme et al., 2010). Tento transkripční faktor také značně potlačuje zánětlivou odpověď (Fan et al., 2003). Podle novějších studií na hlodavcích bylo prokázáno, že PPAR- γ vede ke snížení hmotnosti (Raval et al., 2011). Aktivita PPAR- γ je snížena v aktivovaných HSC (Tsudaka et al., 2006).

1.5.2. Wy-14643

Wy-14643, jejíž racionální název je 2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio) octová kyselina, je heterocyklická sloučenina o molekulové hmotnosti 323,803 g/mol. Její molekulový vzorec je $C_{14}H_{14}ClN_3O_2S$. Můžeme se také setkat s triviálním názvem kyselina pirixinová (Reaxys).



Obr. č. 7: Strukturní vzorec syntetické látky Wy-14643 (Reaxys)

Wy-14643 je středně aktivní agonista PPAR- α a PPAR- γ (Thieme et al., 2010). Expres tohoto transkripčního faktoru PPAR- α tudíž závisí na expozici Wy-14643. Agonisté PPAR- α mají ochranný účinek na řadu orgánů, Wy-14643 v jaterní tkáni snižuje poškození hepatocytů. Tato syntetická látka tlumí zánětlivou reakci, a to prostřednictvím inhibice aktivace NF- κ B a AP-1. Wy-14643 má také antioxidační působení, za nímž stojí enzymy jako superoxidodismutasa, katalasa a glutathion. Tímto způsobem je snižována hladina oxidačního stresu (Shen et al., 2011).

Wy-14643 patří mezi látky s hypolipidemickým účinkem. Jak již bylo zmíněno, peroxisomy jsou důležité v metabolismu lipidů (Moody, Reddy, 1987). PPAR ovlivňuje expresi genů, které jsou zapojeny do β -oxidace mastných kyselin, zároveň snižuje expresi cytochromu P450 2C rodiny a zvyšuje množství mikrosomálních enzymů potřebných při katalýze polynenasycených mastných kyselin (Corton et al., 1998; Petters et al., 1997). Aktivace PPAR- α jejich ligandy vede ke snížení hladiny triglyceridů a zároveň zvyšuje hladinu HDL cholesterolu v krvi (Raval et al., 2011). Wy-14643 tak zabraňuje hromadění lipidů v játrech, což bylo pozorováno u hlodavců, u nichž byla fibróza vyvolaná dlouhodobým podáním stravy nedostatečné na methionin a cholin (MCD). Léčba kyselinou pirixinovou v tomto případě snižuje expresi kolagenu typu I, a tkáňových inhibitorů TIMP-1 a TIMP-2 (Ip et al., 2004). Wy-14643 zvyšuje

buněčnou proliferaci a ta je inhibována neutralizační protilátkou TNF- α . Navíc Wy-14643 mírně zvyšuje expresi TNF- α mRNA v jaterní tkáni. Prostřednictvím TNF- α působí Wy-14643 jako přímý mitogen hepatocytů (Bojes et al., 1997).

Podle studií na myších, kterým byla opakovaně podávána Wy-14643, bylo objeveno více hepatocelulárních novotvarů včetně karcinomů než u myší, kterým látka podána nebyla. Pro nádorovou odpověď je však nutná přítomnost PPAR- α , protože u hlodavců, kterým chyběl gen pro PPAR- α karcinogeneze nebyla identifikována (Petters et al., 1997). Podle novějších experimentů s potkaními játry bylo prokázáno, že podání Wy-14643 zvyšuje expresi PPAR- α -mRNA hepatocytů (Shen et al., 2011).

2. METODY

2.1. Laboratorní potkani

Projekt pokusů byl schválen odbornou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové dne 8. 1. 2001. Veškeré práce se zvířaty byly prováděny ve viváriu LF HK.

Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague-Dawley (Anlab-Praha) o hmotnosti 350-450 g. Potkani byli chováni v klimatizovaných místnostech o teplotě 22 °C a standardní laboratorní dieta jim byla poskytnuta *ad libidum*.

2.2. Perfuze jater

2.2.1. Perfuzní roztoky

Perfuzze jater byla prováděna *in situ*. Postupně byly použity sterilní roztoky: Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku HBSS(-), 0,2 % pronasa a 0,01 % kolagenasa v Hanksově roztoku HBSS. Roztoky byly temperovány na teplotu 37 °C a pH bylo upraveno na 7,35. Průtok roztoků během perfuze byl 10 ml/min.

Po celou dobu perfuze byla teplota jater udržována při 37 °C pomocí lampy se 100 W žárovkou. Teplota byla kontrolována digitálním teploměrem, který byl vsunutý pod játra.

2.2.2. Anestezie zvířete, laparotomie a kanylace *vena portae*

K anestezii byla použita směs Narkamonu v koncentraci 2 ml/kg a Xylasedu v koncentraci 0,5 ml/kg, která byla aplikována intravenózně do *vena saphena*. Potkan byl v celkové anestezii fixován k podložce v poloze na zádech, bylo mu oholeno břicho a operační pole bylo desinfikováno ethanolem.

Břišní dutina byla rozstřižena do tvaru V. Kůže a břišní svaly byly nastříženy ve střední čáře nad symfýzou. Nástřih byl veden laterálně na obě strany a ukončen u žeber potkana. Kůže a svalovina břišní stěny byla překlopena na hrudník potkana.

Játra byla uvolněna od všech ligament. Odklopením jaterních laloků byla kraniálně odkryta portální žíla, čímž byla zbavena okolního tuku a vaziva. Pod *v. portae*

byly vytvořeny tři ligatury, jedna co nejbliže k hilu, druhá a třetí asi 1 cm od jaterního hilu.

Poté byl potkanovi intravenózně do *vena saphena* podán roztok heparinu v koncentraci 2500 U. Po aplikaci bylo provedeno v místě vpichu krátkodobé stlačení. Podvaz blíže střev byl zcela zatažen. Do *vena portae* byla zavedena flexila (Braunůla), která byla upevněna podvazy. Na flexilu byla nasazena proplachovací hadička a byla zahájena perfuze. *Vena cava inferior* byla přestřižena.

Játra byla promyta přibližně 100 ml HBSS(-) a poté perfundována roztokem pronasy a posléze roztokem kolagenasy. Perfuze byla přerušena v okamžiku, kdy došlo k rozrušení struktury jaterních laloků. Po ukončení perfuze bylo vazivo odstřiženo a játra byla vyjmuta.

2.3. Izolace jaterních HSC

V laminárním boxu bylo rozstřiženo jaterní pouzdro a buněčná suspenze přenesena do láhve. K buněčné suspenzi byl přidán 0,001 % roztok DNasy. Poté byla suspenze inkubována po dobu 30 min za třepání při 37 °C. Suspenze buněk byla přefiltrována přes filtr s velikostí pórů 40 µm a doplněna HBSS a centrifugována 7 min při 400 g a teplotě 20 °C. Byl odsát supernatant, buňky byly resuspendovány v HBSS a stejným způsobem centrifugovány.

Buňky byly opět resuspendovány v HBSS a přidán komerční 60 % Optiprep do konečné koncentrace 17 %. Následně byla suspenze promíchána, přenesena do 15 ml zkumavek a převrstvena 11,5 % Optiprepe a 2 ml HBSS. Směs byla centrifugována 17 min při 1 400 g a teplotě 20 °C. Bělorůžová vrstva buněk vytvořená na rozhraní vodné fáze a Optiprepu byla odpipetována, zředěna HBSS a centrifugována při 450 g, čímž byly odstraněny zbytky Optiprepu. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v Dulbecově médiu s 10 % fetálního telecího séra (FBS) a 4 mM L-glutaminem. Do média byl přidán penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml).

Počet buněk byl stanoven počítáním v Bürkerově komůrce, kde byla aplikována směs buněk a trypanové modři. Mrtvé buňky byly obarveny 0,2 % trypanovou modří.

2.4. Kultivace HSC a MFB

2.4.1. Postup kultivace

Buňky byly kultivovány na Petriho miskách o ploše 60 cm² v atmosféře 5 % CO₂ při vlhkosti 85 %. Buňky byly pasážovány jednou za týden a to celkem čtyřikrát. Medium bylo měněno po dvou až třech dnech. Po čtvrté pasáži byly buňky přeneseny na kolagenní nebo fibrinový gel v Petriho miskách o ploše 8 cm² v počtu 300 tisíc. Následující den byly buňky převrstveny gelem. Část buněk byla kultivována na plastu o ploše 60 cm² v počtu 800 tisíc.

Čtvrtý den kultivace byla do média přidána Wy-14643 o koncentraci 100 μM. Buňky byly kultivovány v termostatu v atmosféře 5 % CO₂ a při vlhkosti 85 % po dobu 12 h.

2.4.2. Příprava Wy-14643

Byla použita Wy-14643 o molekulové hmotnosti 328,8. Z této látky a DMSO byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mM. Tento zásobní roztok byl v pokuse 1000 x zředěn na koncentraci 100 μM.

2.5. Příprava gelů pro kultivaci buněk

2.5.1. Izolace kolagenu z ocasních šlach potkana

K přípravě kolagenu byl použit ocas potkaní samice 50 dní staré o hmotnosti kolem 250 g. Ocasní šlachy potkana byly vypreparovány do fyziologického roztoku. Šlachy byly nastříhány na drobné kousky a zváženy. Suspenze ocasních šlach ve fyziologickém roztoku byla pomalu míchána přes noc při 4 °C. Poté byla suspenze zfiltrována přes filtrační papír na Büchnerově nálevce a resuspendována v 0,25 M kyselině octové. Kolagen byl extrahován za míchání po dobu 48 h při 4 °C a poté centrifugován 40 min při 9 000 ot/min.

Koncentrace kolagenu byla stanovena vážkově. Poté byl kolagen naředěn na koncentraci 1,33 mg/ml 0,02 M kyselinou octovou a sterilizován filtrací přes 0,45 μm filtr v laminárním boxu. Poté byl kolagen uchován při 4 °C nebo zmražen při -70 °C.

2.5.2. Příprava kolagenního gelu

3 ml roztoku kolagenu byly smíchány s 1 ml sterilního 4 x DMEM. Tento roztok byl po 1,6 ml pipetován do Petriho misek (8 cm²). Po zpolymerování v inkubátoru byl překryt médiem o objemu 1,5 ml.

2.5.3. Příprava fibrinového gelu

Navážený fibrinogen (3 mg/ml PBS pH 7,4) byl za míchání rozpuštěn. Roztok fibrinogenu a zásobní roztok thrombinu (30 U/ml PBS pH 7,4) byl sterilizován filtrací přes filtr 0,20 µm. Do Petriho misky bylo napipetováno a smícháno 2 µl thrombinu a 1,6 ml fibrinogenu. Roztok v Petriho misce se nechal zpolymerovat 1 h v CO₂ inkubátoru a poté byl překryt 1,5 ml kompletního média.

Vysazení buněk. Následující den byly buňky překryty 0,4 ml gelu. Po jeho zpolymerování bylo misek pipetováno 1,5 ml média. Médium bylo vyměňováno denně.

2.6. Sklizení buněk z gelů

Sklizení buněk, které byly kultivovány na gelech nebo na plastových Petriho miskách bylo prováděno 12 h po přidání sledované látky Wy-14643 do média.

2.6.1. Kontrolní buňky na plastu

Z misek bylo slito médium. Buňky byly dvakrát opláchnuty PBS a jednou TS pufrem. Po dalším přidání TS pufru byly buňky seškrábnuty buněčnou škrabkou a vypláchnuty TS pufrem do zkumavky, která byla následně centrifugována 5 min při 3500 ot/min a teplotě 4 °C. Byl odstraněn supernatant, přidán lyzační roztok GTC(+) a buňky byly resuspendovány.

2.6.2. Buňky v gelech

Z misek bylo slito médium. Gely byly opláchnuty PBS, přeneseny do skleněných zkumavek Corex a centrifugovány 5 min při 1200 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a zbytek gelu byl rozpuštěn v nasyceném roztoku GTC(+) s merkaptoethanolem. Lyzáty byly zpracovány ihned nebo uchovávány při -70 °C.

2.7. Izolace RNA

2.7.1. Izolace RNA fenol-chloroformovou metodou

2.7.1.1. Princip

Principem metody je extrakce. K buněčnému lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu. Organické rozpouštědlo chloroform se nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu. Směs se proto rozdělí na dvě fáze: horní vodnou obsahující RNA a dolní organickou fázi. Po protřepání dojde k mísení fází a po ustálení se na rozhraní mezi fázemi objeví bílý prstenec sražených proteinů.

2.7.1.2. Postup

K buněčnému lyzátu byl přidán 2M octan sodný o pH 4,0 a směs byla opatrně promíchána. Ke směsi byly přidány roztoky fenolu nasyceného vodou, chloroform a isoamylalkoholu. Tato směs byla 10 s vortexována a pak 15 min inkubována v ledu. Poté byla směs centrifugována 15 min při 14 000 g a teplotě 4 °C. Horní vodná fáze obsahující RNA byla opatrně odsáta a přenesena do nové zkumavky. Byl přidán 3M octan sodný o pH 5 a ledový isopropanol. Směs byla promíchána a inkubována 24 h při -70 °C. Vysrážená RNA byla třikrát promyta vychlazeným 75 % ethanolem. Poté byl ethanol odpařen na vzduchu a RNA byla rozpuštěna ve vodě prosté RNas.

2.7.2. Přečištění RNA na kolonách Nucleospin® RNA XS

2.7.2.1. Princip

RNA byla přečištěna pomocí kitu Nucleospin® RNA XS. Přečištění probíhalo dle návodů výrobce.

Technologie kitu je založena na kombinaci selektivní vazebné schopnosti membrány na bázi silikagelu a rychlosti microspinové technologie. Specializovaný systém pufrů s vysokým obsahem solí umožňuje vazbu RNA delší než 200 bazí na membránu. Vzorek je aplikován na membránu, kde je RNA navázána, přičemž ostatní složky jsou vymyty.

2.7.2.2. Postup

Byla vytvořena směs RA1 a nedenaturovaného ethanolu v poměru 1:3. S ní byl smíchán vzorek v poměru 1:1 a následně promíchán. Směs byla nanášena na kolonku Nucleospin® RNA XS a centrifugována 30 s při 11 000 g. Po vylití eluátu ze zkumavky bylo na kolonku nanášeno 400 µl pufru RA3 a byla opět centrifugována 30 s při 11 000 g. Po vylití eluátu bylo nanášeno 200 µl pufru RA3a centrifugováno 2 min při 11 000 g do vysušení membrány. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky a RNA bylo eluováno 10 µl RNase-free H₂O centrifugací 30 s při 11 000 g.

2.7.3. Měření koncentrace RNA spektrofotometricky

Pro měření koncentrace RNA byl dávkován 1 µl vzorku, který byl měřen při vlnových délkách 260 nm, což je absorpční maximum nukleových kyselin a 280 nm, což je absorpční maximum proteinů. Poměr absorbancí těchto vlnových délek určil čistotu RNA. Pokud je poměr $A_{260/280}$ vyšší než 2,0, jedná se o čistou RNA.

2.7.4. Kontrola kvality RNA gelovou elektroforézou

2.7.4.1. Princip gelové elektroforézy

Ke kontrole čistoty RNA se nejčastěji používá gelová elektroforéza. Principem této metody je rozdělování molekul s různou velikostí a nábojem v elektrickém poli. Jako nosič se používá agarosový gel, který působí jako molekulární síto. Velké molekuly se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zadržovány. Molekuly RNA se díky svému negativnímu náboji pohybují směrem ke kladné elektrodě. Pro detekci se používá interkalační barvivo ethidium bromid, který po navázání s RNA fluoreskuje v UV-světle.

2.7.4.2. Postup

K elektroforéze bylo použito 0,5 µg RNA a stejné množství denaturačního pufru. Poté byl přidán 1 µl ethidium bromidu ze zásobního roztoku o koncentraci 50 µl/ml.

360 mg agarosy bylo suspendováno v 30 ml borátového pufru (1g/100 ml). Vytvořená suspenze byla zahřívána v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Po vychladnutí byly přidány 2 ml 36 % formaldehydu a tento roztok byl nalit na elektroforetickou desku se vsunutým hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany, která byla naplněna pufrem, a byly napipetovány vzorky. Elektroforéza probíhala 1 h při napětí 40 V.



Obr. č. 8: Kontrola kvality RNA pomocí gelové elektroforézy (zdroj: DP)

2.8. Reverzní transkripce RNA

2.8.1. Princip

Enzym reverzní transkriptasa katalyzuje syntézu řetězců DNA, které jsou komplementární k templátům RNA. Reverzní transkripcí je získána cDNA, což je DNA komplementární ke studované mRNA. Výsledné molekuly cDNA se následně amplifikují pomocí PCR.

2.8.2. Postup

Bylo připraveno 10 μ l vzorku obsahujícího 1 μ g RNA. Ke vzorku bylo přidáno 10 μ l premixu podle tabulky č. 3. Tento roztok byl umístěn do termocyklieru a inkubován podle teplotního programu.

Tab. č. 3: Premix pro syntézu cDNA

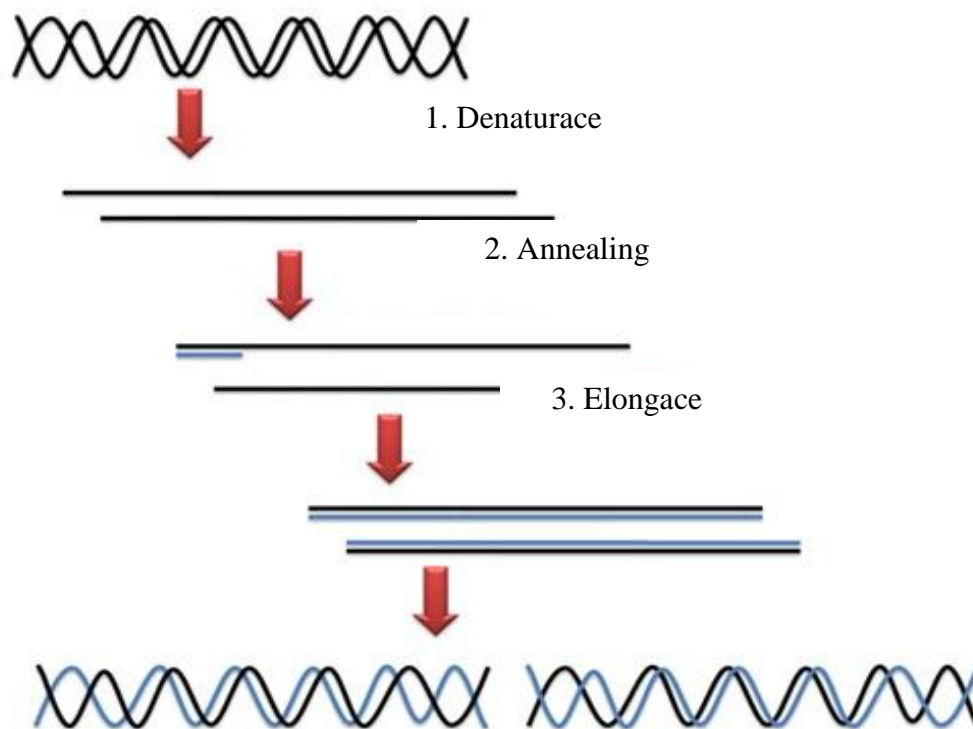
	1 reakce (μl)
10 x RT pufr	2,0
25 x dNTP směs	0,8
10 x random primery	2,0
Multiscribe RT (50 U/μl)	1,0
RNas prostá voda	4,2
celkem	10,0

2.9. Real time RT PCR (RT-rt PCR)

2.9.1. Princip

Polymerasová řetězová reakce je metoda používaná k amplifikaci specifické nukleotidové sekvence DNA. PCR probíhá v opakujících se cyklech, které se skládají ze 3 kroků:

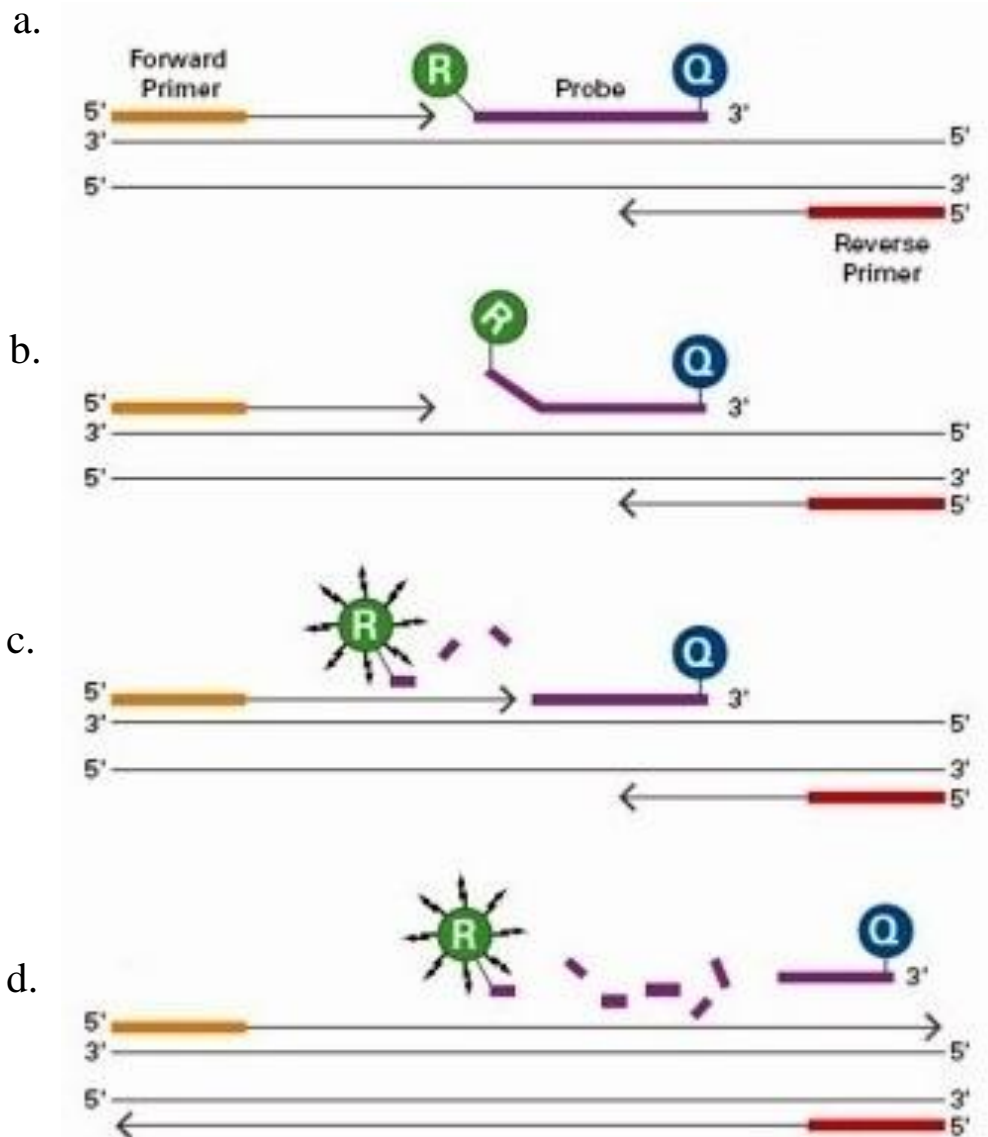
1. **Denaturace:** DNA se zahřeje na 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozpojení obou komplementárních řetězců dvoušroubovice DNA a vzniku jednovláknové DNA.
2. **Annealing:** Ochlazením na teplotu 45-65 °C dojde k hybridizaci primerů ke komplementárním úsekům jednovláknové DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymerasa.
3. **Elongace:** Teplota se zvýší na 65-75 °C. Teplota závisí na použité DNA polymerase. Optimální reakční teplota pro DNA polymerasu Taq je 72 °C. V této fázi DNA polymerasa syntetizuje nový řetězec DNA, který je komplementární k templátu.



Obr. č. 9: Princip PCR (zdroj: www.molecularstation.com 2011)

Real-time PCR (PCR v reálném čase) je metoda založena na kontinuálním měření ampliconů přímo při jejich vzniku. K detekci se využívají sondy značené fluorescenčním barvivem. Specifické sondy jsou založeny na principu přenosu fluorescenční rezonanční energie.

Nejpoužívanější je metoda hydrolyzačních sond (TaqMan sondy), založena na 5' → 3' exonukleázové aktivitě. Na jeden konec sondy je umístěno fluorescenční barvivo (fluorofor) a na druhý konec zhášec fluorescence (quencher). Při syntéze komplementárních vláken DNA polymerasa sondu rozloží a tím dochází k oddálení fluoroforu a zhášeče. Uvolní se fluorescenční barvivo a dochází k nárůstu intenzity fluorescence, která určuje množství PCR produktu. Fluorescence se měří během každého cyklu PCR.



Obr. č. 10: Princip hydrolyzačních sond
(zdroj: upraveno dle www.asuragen.com 2011)

- Polymerace:** Fluorofor (R) a zhášec (Q) jsou navázány na 3' a 5' konce TaqMan sondy.
- Přemístění:** Elongace řetězce. TaqMan polymerasa prodlužuje řetězec ve směru 5' → 3' konci. Záření emitované fluoroforem je pohlcováno zhášecem.
- Rozštěpení:** Po přiblížení TaqMan polymerasy k sondě se fluorofor odštěpí. Fluorofor se vzdálí od zhášecce, což se projeví vzestupem intenzity fluorescence.
- Polymerizace:** Polymerasová reakce je dokončena. Fluorofor je vzdálen od zhášecce, je patrné fluorescenční záření.

2.9.2. Postup

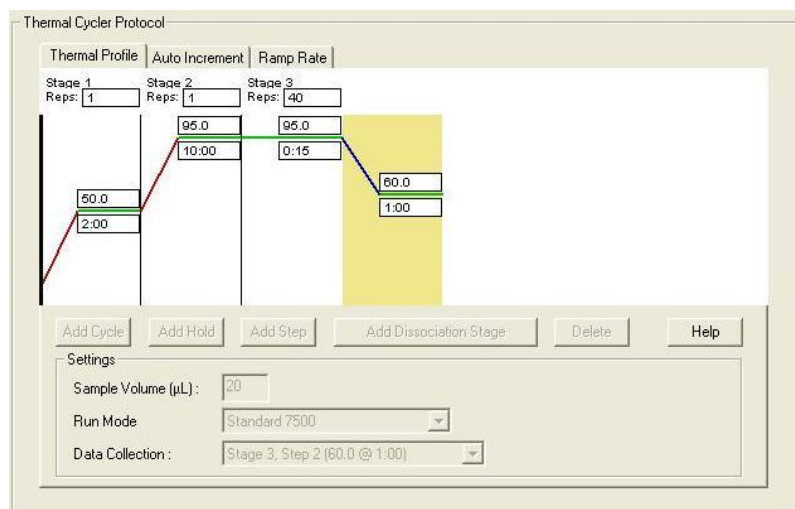
Na real-time PCR byl použit TaqMan Universal Master Mix a sonda TaqMan Gene Expression Assay. Jako vnitřní kontrola (housekeeping gene) byl použit gen 18S.

cDNA byla naředěna 1:10. Z jednoho ze vzorků byla vytvořena kalibrační řada a byl dále naředěn na koncentrace 1:100, 1:1000 a 1:10000. Při ředění 1:10 byla stanovena kvantita rovná jedné, při dalším ředění 0,1; 0,01; 0,001. Premix byl připraven smícháním Master Mixu se sondou, primery a cDNA podle tabulky č. 4.

Tab. č. 4: Premix pro syntézu RT-rt PCR

	1 reakce (μl)
2x TaqMan Master Mix	10
1. sonda + primery	1
naředěná cDNA	9
celkem	20

Směs premixu byla rozpipetována po 11 μl na jamku. K premixu byla v duplikátu napipetována naředěná cDNA po 9 μl. Jako negativní kontrola byla použita injekční voda, kterou byla cDNA nahrazena. Mikrotitrační destička byla překryta ochrannou fólií, protřepána a stočená na centrifuze. Poté byla vložena do termocykleru pro RT-rt PCR 7500 Fast, kde byl spuštěn teplotní program ve standardním modu (Obr. č. 11).



Obr. č. 11: Teplotní profil reakce (zdroj: DP)

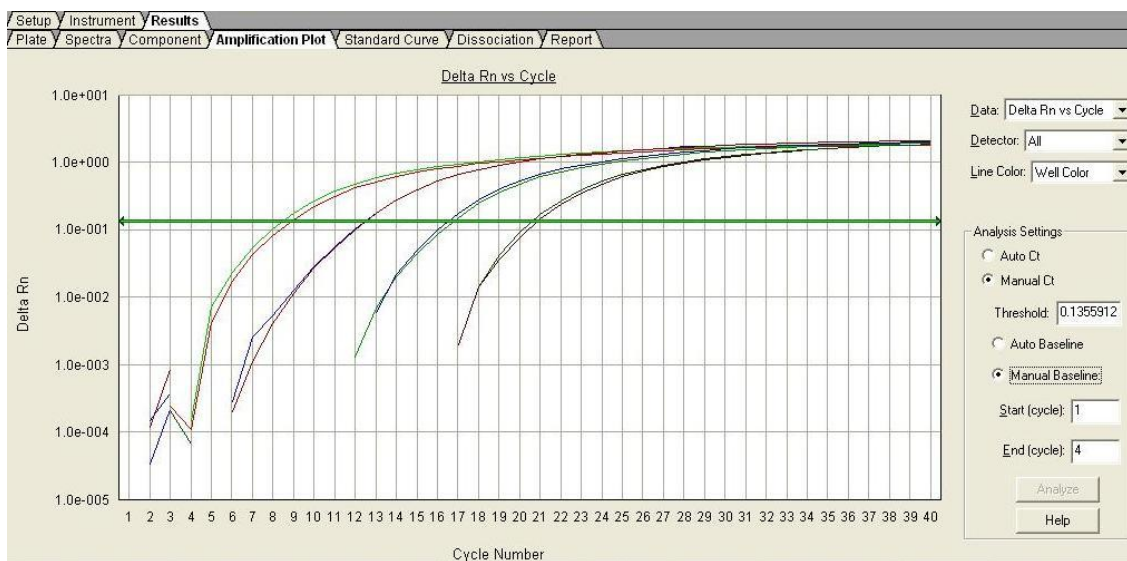
2.9.3. Stanovení kvantity genové exprese

Ke kvantifikaci genové exprese odečítáme hodnotu Ct (threshold cycle), což je počet cyklů PCR, při kterém dojde k nárůstu fluorescence a protnutí stanoveného prahu (threshold). Je to cyklus, při kterém cílový (target) i referenční gen dosáhnou stejné úrovně fluorescence. Pomocí Ct hodnoty lze určit kvantitu genové exprese.

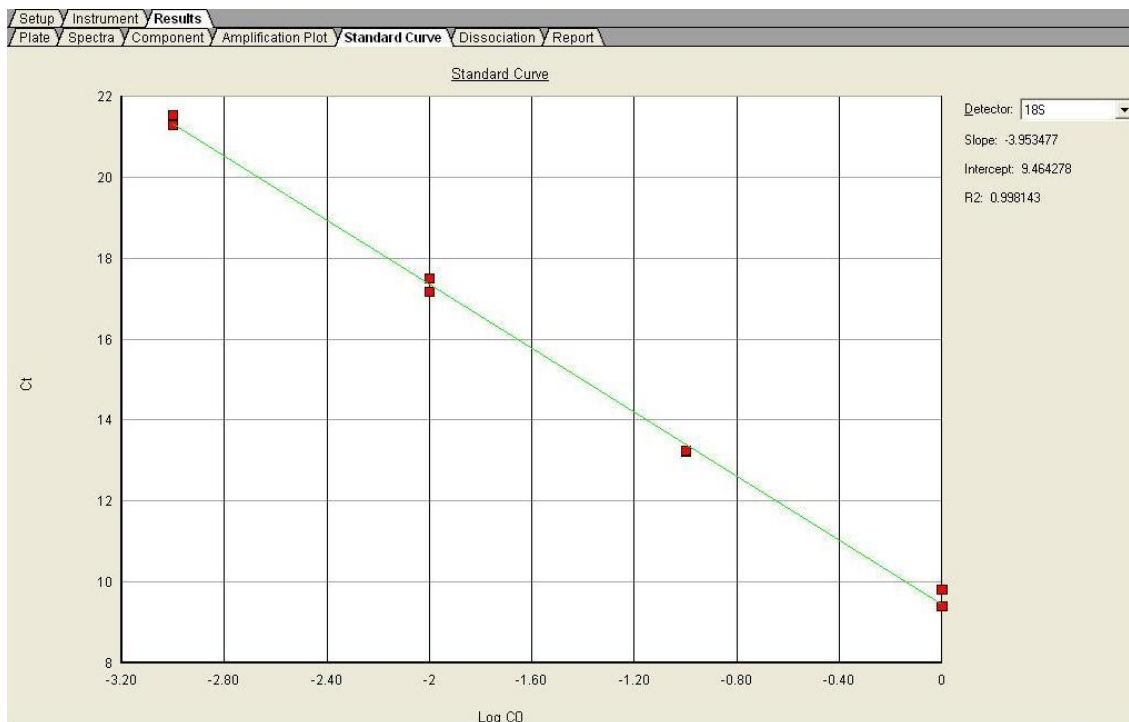
K výpočtům při kvantifikaci se využívají hodnoty v exponenciální fázi PCR (Obr. č. 12-16). Ke stanovení kvantity DNA je možné použít absolutní nebo relativní kvantifikaci. Absolutní kvantifikace udává přesné množství templátu. Relativní kvantifikace zaznamenává změny exprese genů mezi vzorky, a to jako poměr exprese cílového genu proti referenčnímu (housekeeping) genu, což je vnitřní kontrola se stabilní expresí.

Pro analýzu dat byl použit software 7500 Fast systém SDS. Pomocí tohoto softwaru byl nastaven treshold, který musí být umístěný v logaritmické části křivky nárůstu produktu. Následně byla automaticky nastavena tzv. base line, která odděluje signál od šumu. Software vypočítal pomocí kalibrační řady hodnoty Ct a poté relativní kvantitu cílového genu ve vzorcích. Výsledná kvantita genové exprese byla vypočítána pomocí vzorce:

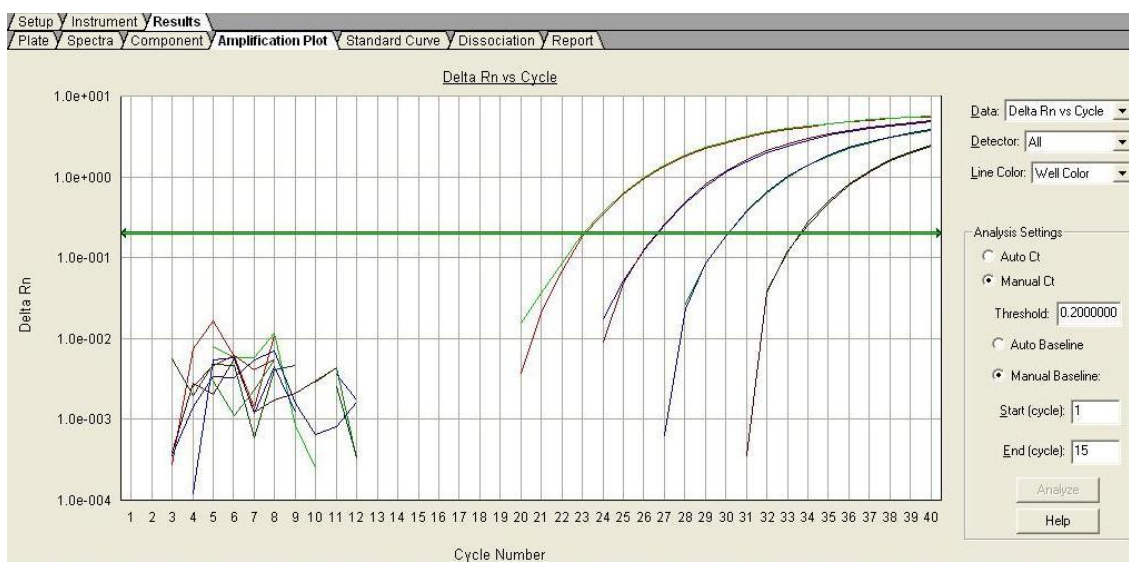
$$\text{výsledná kvantita} = \frac{\text{relativní kvantita cílového genu}}{\text{relativní kvantita referenčního genu}}$$



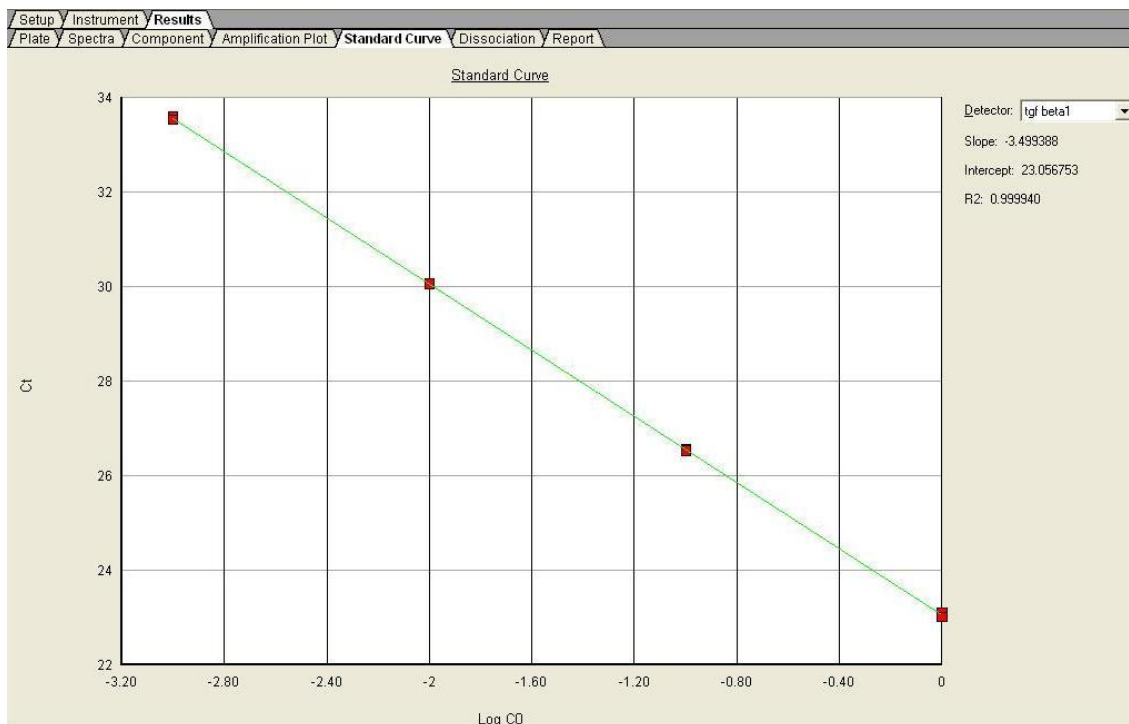
Obr. č. 12: Kalibrační křivka referenčního genu 18S (zdroj: DP)



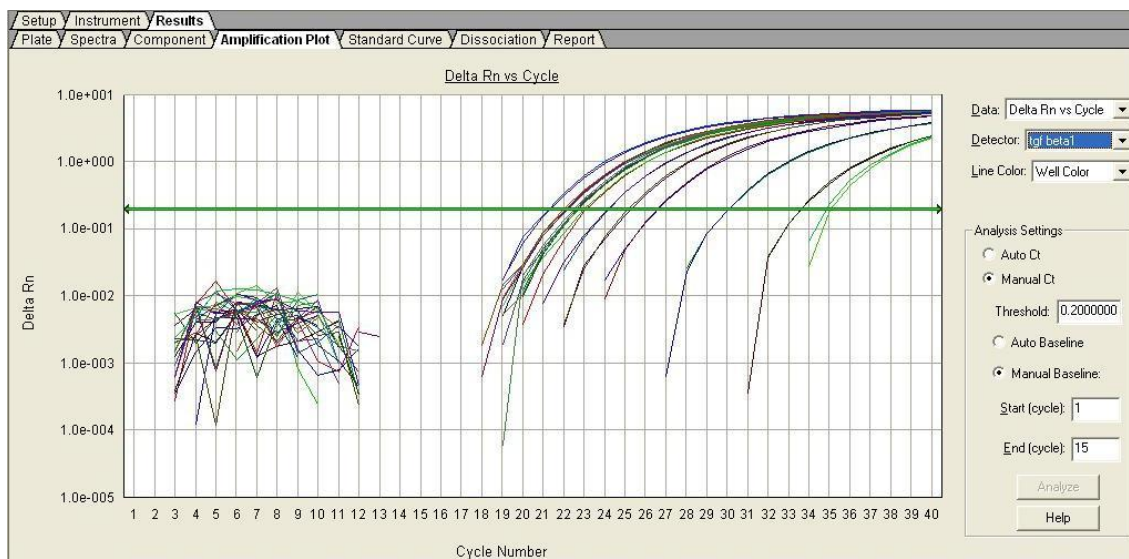
Obr. č. 13: Kalibrační křivka referenčního genu 18S (zdroj: DP)



Obr. č. 14: Kalibrační křivka genu TGF- β 1 (zdroj: DP)



Obr. č. 15: Kalibrační křivka genu TGF- β 1 (zdroj: DP)



Obr. č. 16: Křivka nárůstu produktů genu TGF- β 1 (zdroj: DP)

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel, kde byla provedena také statistická analýza dat pomocí Studentova t-testu ($p \leq 0,05$).

2.10. Příprava bílkovin pro westernový přenos

Po enzymatické izolaci byly buňky promíchány roztokem PBS, který obsahoval 4 mM roztok EDTA. Poté byly bílkoviny extrahovány lyzačním puřrem 1 h v ledu za občasného protřepání. Následně byla směs centrifugována, aby se odstranily nerozpustné bílkoviny. V extraktu byl pak stanoven obsah bílkovin.

2.11. Měření koncentrace bílkovin

Byla připravena koncentrační řada standardů v duplikátu podle tabulky č. 5 a roztoky vzorků v tripletech. 1 μ l vzorku byl smíchán s 9 μ l destilované vody a 200 μ l pracovního roztoku WS (roztok CuSO_4 : roztok BCA v poměru 1:50). Mikrotitrační destička se vzorky byla inkubována 30 min při 37 °C. Absorbance byla měřena při 562 nm. Pomocí kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace vzorků.

Tab. č. 5: Koncentrační řada standardů

	Protein standard (μ l)	destilovaná voda (μ l)	WS (μ l)
S1	0	10	200
S2	2	8	200
S3	4	6	200
S4	6	4	200
S5	8	2	200
S6	10	0	200

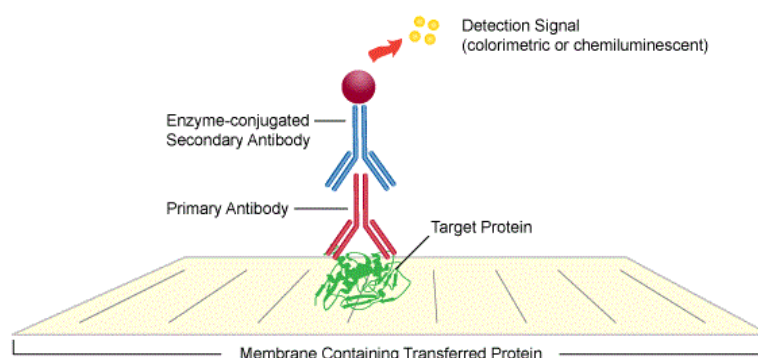
2.12. Westernový přenos

2.12.1. Princip

Westernový přenos zahrnuje polyakrylamidovou elektroforézu, což je metoda důležitá pro separaci a charakterizaci proteinů. Jednotlivé proteiny jsou separovány za přítomnosti aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který se váže k proteinům. Proteiny následně získají záporný náboj a válcovitý tvar.

Po proběhnutí elektroforézy se rozdělené polypeptidy pomocí elektrického proudu přenesou z gelu na nitrocelulosovou membránu. Nespecifické vazby se zablokují přidáním sušeného odtučněného mléka.

Následně se k jednotlivým proteinům přidá primární specifická protilátka (v našem případě králičí). Přítomnost primární protilátky se detekuje inkubací se sekundární protilátkou (proti králičí protilátce). Využívá se principu chemiluminiscence, kdy uvolněné záření je detekováno přiložením světlocitlivého filmu.



Obr. č. 17: Detekce pomocí protilátek při westernovém přenosu
(zdroj: http://www.leinco.com/general_wb 2012)

2.12.2. Postup

Vzorky byly připraveny z 10 µg bílkoviny a naneseny do jamek spacer gelu ponořeného v running pufru. Elektroforéza probíhala 2 h při napětí 150 V.

Running gel byl vyříznut a promýván 5 min v transfer pufru. Nitrocelulosová membrána byla aktivována 10 min v 30 % methanolu. Do transferové kazety byl vložen gel a nitrocelulosová membrána. Kazeta byla vložena do kyvety naplněné transfer

puřrem. Přenos trval 2 h při proudu 350 mA a napětí 100 V. Poté byla membrána promyta 2 x 5 min v TBS a 1 min inkubována s barvivem Ponceau S Red. Po vyznačení polohy standardních proteinů byla opět promyta 2 x 5 min v TBS.

K membránám byl přidán 5 % roztok odtučněného sušeného mléka. Poté byly inkubovány přes noc při 7 °C za třepání s primární protilátkou v parafinovém obalu. Poté byla membrána promyta TBS-T 5 x 10 min a TBS 1 x 10 min a vložena do sekundární protilátky alespoň na 60 min. Po promytí TBS-T 3 x 10 min a TBS 1 x 10 min byla membrána pokapána luminolovým činidlem. Na vlhkou membránu zabalenou v polyethylenové fólii byl přiložen rentgenový film, který se nechal vyvolat.

2.12.3. Vyhodnocení

Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti anionaktivního detergentu dodecylsulfátu sodného závisí na molekulové hmotnosti proteinů.

Byla vynesena závislost logaritmu molekulových hmotností polypeptidových řetězců na elektroforetické mobilitě. Následně byla získána křivka, pomocí které byly vypočteny hodnoty molekulových hmotností jednotlivých proteinů (Weber, Osborn, 1969).

2.13. Statistická analýza

Pro statistickou analýzu dat byl použit studentův t-test, který testuje, zda se střední hodnota výběru shoduje s nulovou hypotézou.

Hladina významnosti byla $p = 0,05$.

2.14. Chemikálie a přístroje

2.14.1. Chemikálie

2.14.1.1. Chemikálie použité při perfuzi jater, izolaci, kultivaci buněk a na přípravu gelů

dimethylsulfoxid – DMSO (Sigma)

DNasa I (Roche)

fetální telecí sérum - FBS (PAA)
glutamin (Gibco)
Hanksův solný roztok s vápníkem a hořčíkem - HBSS (Gibco)
Hanksův solný roztok bez vápníku a hořčíku - HBSS(-) (Gibco)
heparin (Zentiva)
hovězí fibrinogen (Sigma)
hovězí thrombin (Sigma)
kolagen z potkaních šlach
kolagenasa (Roche)
kultivační médium DMEM (PAA)
Narkamon (Bioveta)
Optiprep (Nycomed)
penicilin G, K salt (Serva)
pronasa 0,2 % (Roche)
streptomycin sulfát (Serva)
Wy-14643 (Cayman)
Xylased (Bioveta)

2.14.1.2. Chemikálie použité při sklizení buněk

PBS pufr o pH 7,4 (NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₂O)
GTC(-) pufr (guanidium isothiokyanát, 0,25 M citrát sodný)
GTC(+) pufr (guanidium isothiokyanát, citrát sodný, 0,1M merkaptoethanol)
merkaptoethanol (Serva)
TS pufr o pH 7,4 (1,5 M NaCl, 100 mM Tris, 15 mM MgCl₂)

2.14.1.3. Chemikálie použité při izolaci RNA, přečištění RNA na kolonách a měření její koncentrace

ethanol (Lachner)
fenol (Fluka)
H₂O RNase-free
chloroform (Sigma)
isopropanol (Sigma)

NucleoSpin® RNA XS kit (Biotech)
 octan sodný 2 M o pH 4,0 (Sigma)
 octan sodný 3M o pH 5,0 (Sigma)
 TRIS-HCl o pH 7,5 (tris(hydroxymethyl)aminomethan + HCl)

2.14.1.4. Chemikálie použité při kontrole kvality pomocí gelové elektroforézy

agarosa Seakem LE (FMC Bio Products)
 borátový pufr 10 x (0,5 M kyselina boritá, 50 mM tetraboritan sodný, 100 mM síran sodný, 10 mM EDTA, H₂O)
 formaldehyd (FLUKA)
 ethidium bromid (Sigma)
 denaturační pufr (formamid, 37 % formaldehyd, 10 x borátový pufr, glycerol, 2 % vodný roztok bromfenolové modři, H₂O)

2.14.1.5. Chemikálie použité při syntéze cDNA a RT-rt PCR

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)
 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
 sondy TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

Tab. č. 6: Sondy použité při syntéze cDNA a RT-rt PCR

Gen	GenBank přístupové číslo	Katalogové číslo
MMP-2 (želatinasa A)	NM_031054.2	Rn02532334_s1
MMP-9 (želatinasa B)	NM_031055.1	Rn00579162_m1
PPAR- α	NM_013196.1	Rn00566193_m1
OPN-1	NM_012881.2	Rn00563571_m1
TGF- β 1	NM_021578.2	Rn00572010_m1
18S RNA	NR_003286.2	Hs03003631_g1

2.14.1.6. Chemikálie použité při přípravě bílkovin, měření koncentrace a westernovém přenosu

BCA (kyselina bicinchoninová)

luminolové činidlo (Santa Cruz)
Laemliho pufr 10 % (Serva)
lyzační pufr (20mM, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton,
2,5 mM sodium pyrophosphate, 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄,
1 μg/ml leupeptin)
methanol (Lachner)
nitrocelulózová membrána Hybond 0,20 μM (Amersham Biosciences)
odtučněné sušené mléko, 5 % roztok v TBS (Bio-Rad)
PBS (s 4 mM EDTA)
Ponceau (0,5 % Ponceau S Red, 1 % kyselina octová)
primární protilátky:
 králičí MMP-2, H-76 (Santa Cruz)
 králičí MMP-9, H-129 (Santa Cruz)
 králičí OPN, ab63856 (Abcam)
 králičí PPAR-α, ab45859 (Abcam)
 králičí TGF-β, sc-146 (Santa Cruz)
TBS-T (TBS, Tween 20)
TBS o pH 7,5 (Tris-HCl, NaCl, H₂O)
transfer pufr o pH 8,3 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 20 % methanol, H₂O)
sekundární protilátka proti králičí protilátce 1:1000 (Santa Cruz)
SERVAgel/TM Gradient 8-16 % (Serva)
síran měďnatý (Lachema)

2.14.2. Přístroje

centrifuga (Hettich Universal 16)
centrifuga (Hettich 32 R)
CO₂ inkubátor pro buněčné kultury (Snijders Scientific)
digitální teploměr
homogenizátor ULTRA-TURRAX T 10 basic (IKA)
inverzní mikroskop (Nikon)
mikrovlnná trouba (Daewoo)

peristaltická pumpa (Verder)
pH metr (WTW)
spektrofotometr NanoPhotometr (Implen)
třepačka (Biometra)
UV transiluminátor (UPV)
zařízení pro elektroforézu EASY-CAST model B1A (OWL Scientific)
zdroj pro elektroforézu (E-C Apparatus Corporation)
termocykler pro real-time PCR 7500Fast (Applied Biosystems)
termocykler pro PCR T-personal (Biometra)
vortex (Scientific Industries)
vyvolávací automat Mediphot 900E

2.14.3. Nástroje a materiál

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

2.14.4. Použitý software

7500 Fast System SDS Software version 1.3.1
Microsoft Excel 2007

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimenty byly prováděny na buňkách jaterních MFB, které byly získány z jater potkanů kmene Sprague-Dawley. Buňky byly opakovaně pasážovány a po čtvrté pasáži vysazeny na trojrozměrný fibrinový gel. Po 5-ti dnech kultivace byla k buňkám přidána Wy-14643 o koncentraci 100 μ M a tato směs byla opět kultivována 12 h. Koncentrace látky a časový údaj působení Wy-14643 na jaterní MFB byl zvolen podle výsledků předchozích experimentů (Čevelová 2009, Šafka 2011).

Poté byla izolována RNA a dále sledována exprese 5-ti genů. Byl zkoumán nejen vliv Wy-14643 na expresi genů, ale i po posttranslačních modifikacích na expresi bílkovin. V první části experimentu jsme stanovovali expresi genů pomocí RT-rt PCR, v druhé části jsme pomocí westernového přenosu sledovali expresi bílkovin a vliv kultivačního média.

3.1. Vliv Wy-14643 na expresi genů jaterních MFB

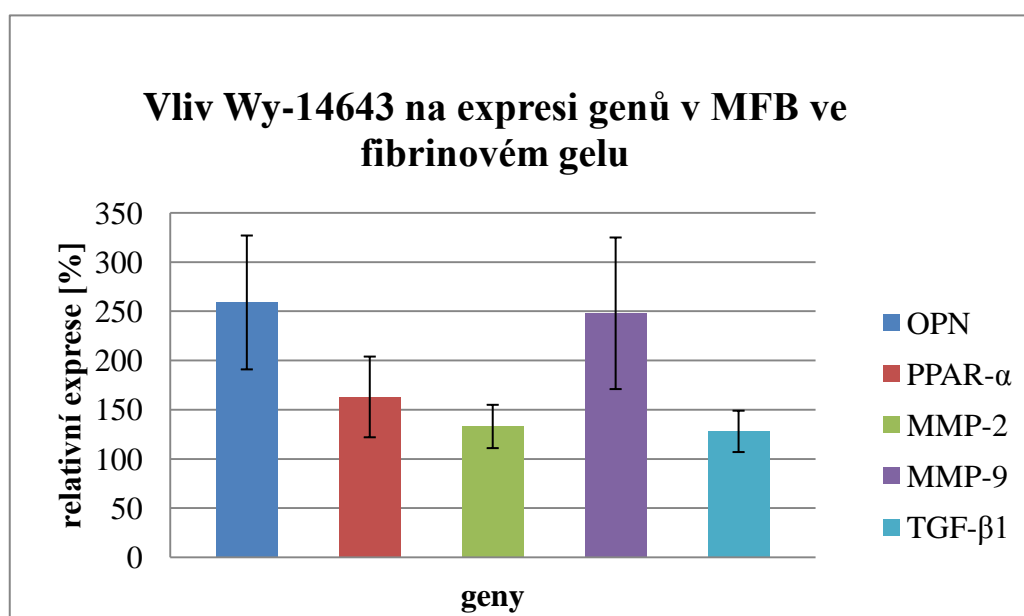
Pomocí RT-rt PCR jsme sledovali vliv Wy-14643 na expresi genů v buňkách jaterních MFB kultivovaných v trojrozměrném fibrinovém gelu. Mezi ovlivnitelné geny jsme zařadili protein ECM OPN, receptor PPAR- α , metaloproteinasy MMP-2 a MMP-9 a nakonec růstový faktor TGF- β 1.

V tabulce č. 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty relativní exprese 5-ti genů v procentech spolu se standardní chybou průměru (SEM), které jsou vztaženy k expresi kontrolních buněk, které nebyly ovlivněny Wy-14643 a byla jim přiřazena hodnota relativní exprese genu 100 %. K výpočtu průměru bylo použito 5 hodnot exprese genů a pomocí Studentova t-testu určena statistická významnost.

Tab. č. 7: Vliv Wy-14643 na expresi genů ve fibrinovém gelu

Gen	Exprese
OPN	259 ± 68
PPAR- α	163 ± 41
MMP-2	133 ± 22
MMP-9	248 ± 77
TGF- β 1	128 ± 21

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



Graf č. 1: Vliv Wy-14643 o koncentraci 100 μ M na expresi genů v jaterních MFB kultivovaných ve fibrinovém gelu

Z tabulky č. 7 a grafu č. 1 je zřejmé, že žádný z výsledků změny genové exprese po přidání Wy-14643 k buňkám MFB kultivovaných ve fibrinovém gelu nebyl statisticky významný, pouze u OPN byla změna exprese na hranici statistické významnosti. U všech genů došlo ke zvýšení exprese. Největší změna byla pozorována u OPN, kde se hladina genové exprese zvýšila více než dvojnásobně. Podobně je tomu v případě MMP-9. U PPAR- α se genová exprese zvýšila přibližně o polovinu, kdežto u MMP-2 a MMP-9 byla genová exprese mírně zvýšená.

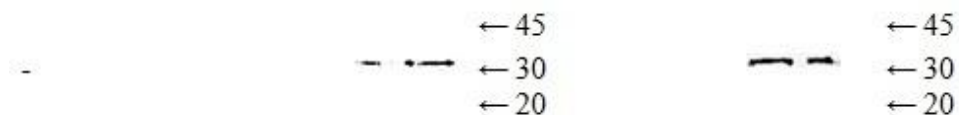
3.2. Vliv Wy-14643 na expresi bílkovin jaterních MFB

Pomocí westernového přenosu jsme sledovali nejen vliv Wy-14643 na expresi bílkovin v buňkách jaterních MFB, ale i vliv kultivačního prostředí. V tomto experimentu jsme sledovali kvalitativní změny exprese bílkovin.

Jaterní MFB jsme kultivovali jak běžným způsobem na polystyrenových Petriho miskách, tak i v trojrozměrném kolagenním a fibrinovém gelu. Použili jsme stejné geny jako v předchozím pokusu, a to OPN, PPAR- α , MMP-2, MMP-9 a TGF- β 1. Jako kontrolní vzorek byl použit roztok DMSO a paralelně vedle něj se dávkoval vzorek obsahující Wy-14643, kdy tato látka byla na pokus připravena smísením s DMSO. Vzorky na plastu a kolagenu byly zpracovány paralelně, vzorky ve fibrinovém gelu byly zpracovány samostatně.

Osteopontin (OPN)

Plast		Kolagenní gel		Fibrinový gel	
DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643



Paralelně: plast, kolagenní gel:

Teoretická molekulová hmotnost: 32 kDa

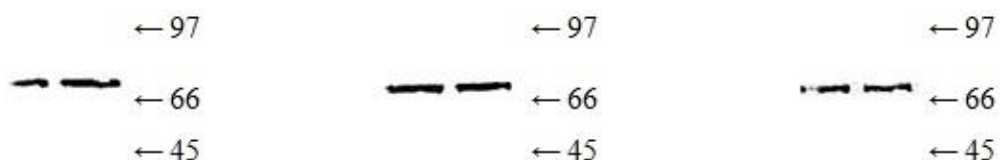
Plast: Žádný proužek ani po přidání Wy-14643. U buněk kultivovaných na plastu nebyly nalezeny žádné bílkoviny.

Kolagenní gel: Výraznější proužek po přidání Wy-14643. Proteiny jsou patrné v oblasti molekulové hmotnosti 37 kDa. Wy-14643 expresi proteinů ovlivňuje.

Fibrinový gel: Intenzivnější proužek než v případě kolagenního gelu, který se nachází v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 33 kDa. Wy-14643 nemá vliv na expresi proteinů, je patrný pouze vliv fibrinového gelu.

PPAR- α

Plast		Kolagenní gel		Fibrinový gel	
DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643



Paralelně: plast, kolagenní gel:

Teoretická molekulová hmotnost: 53 kDa

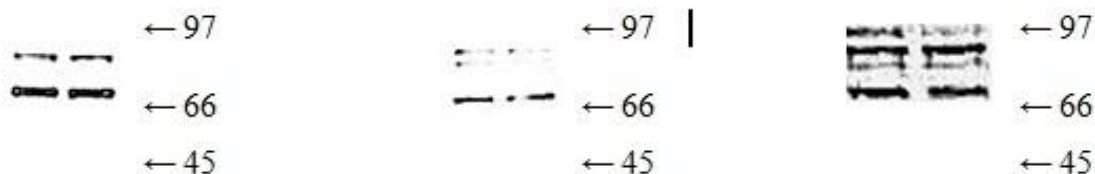
Plast: Intenzivní proužek v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 69 kDa. Wy-14643 ovlivňuje expresi bílkovin, neboť po jejím přidání je proužek nepatrně intenzivnější.

Kolagenní gel: Intenzivní proužek umístěný v oblasti 69 kDa, podobně jako v případě buněk kultivovaných na plastu. Wy-14643 expresi bílkovin nemění.

Fibrinový gel: Méně intenzivní proužek oproti předchozím médiím. Proteiny se nachází v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 68 kDa. Stejně jako v případě kolagenního gelu Wy-14643 neovlivňuje expresi bílkovin. Pozorujeme pouze vliv média.

MMP-2

Plast		Kolagenní gel		Fibrinový gel	
DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643



Paralelně: plast, kolagenní gel:



Teoretická molekulová hmotnost: 72 kDa (pro neaktivní formu proenzymu pro-Mmp-2)

Plast: 2 proužky v oblasti mezi 66-97 kDa. Horní proužek je méně intenzivní, značí neaktivní formu proenzymu pro-MMP-2 a odpovídá molekulové hmotnosti 85 kDa. Dolní proužek má vyšší intenzitu a značí aktivní formu MMP-2, která má molekulovou hmotnost 74 kDa. Není prokázán vliv Wy-14643.

Kolagenní gel: 2 proužky v oblasti mezi 66-97 KDa. Horní proužek má velmi malou intenzitu a odpovídá molekulové hmotnosti 93 kDa. Dolní intenzivnější proužek značící aktivní formu MMP-2 má molekulovou hmotnost 71 kDa. Intenzita proužků je nižší než u buněk kultivovaných na plastu nebo ve fibrinovém gelu. Stejně jako v předchozím případě Wy-14643 nemění expresi bílkovin.

Fibrinový gel: 4 proužky v oblasti mezi 66-97 Da. Horní, méně intenzivní proužek, odpovídá molekulové hmotnosti 97 kDa, intenzivnější proužek pod ním značící neaktivní formu odpovídá 86 kDa a dolní intenzivní proužek značící aktivní formu MMP-2 odpovídá 73 kDa. Vidíme zde vliv fibrinového gelu. Dále je patrné, že Wy-14643 expresi proteinů neovlivňuje.

MMP-9

Plast		Kolagenní gel		Fibrinový gel	
DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643



Paralelně: plast, kolagenní gel:

Teoretická molekulová hmotnost: 92 kDa

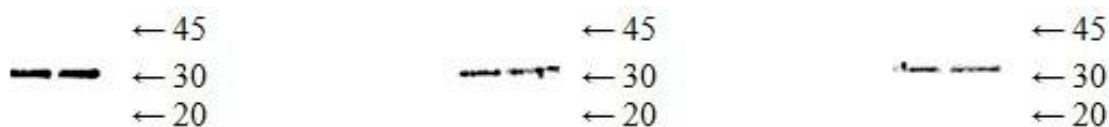
Plast: Středně intenzivní proužek detekující bílkoviny odpovídající molekulové hmotnosti 85 kDa. Buňky kultivovány na plastu byly mnohem lépe pozorovány než v kolagenním a fibrinovém gelu. Studovaná Wy-14643 neovlivňuje expresi proteinů.

Kolagenní gel: 2 velmi slabé proužky. Jeden se nachází, podobně jako v kolagenním gelu, v oblasti kolem 85 kDa a lze jej pozorovat pouze po přidavku pozorované Wy-14643. Druhý proužek odpovídá 50 kDa, což je mnohem nižší molekulová hmotnost. Je to zřejmě způsobeno degradací MMP-9 v kolagenním gelu. MMP-9 reagují s protilátkou a jejich význam není jasný. Wy-14643 expresi proteinů neovlivňuje.

Fibrinový gel: Zde nebyly pozorovány žádné bílkoviny ani po přidání Wy-14643. Je to zřejmě způsobeno vlivem fibrinového gelu.

TGF- β 1

Plast		Kolagenní gel		Fibrinový gel	
DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643	DMSO	Wy-14643



Paralelně: plast, kolagenní gel:



Teoretická molekulová hmotnost: 25 kDa

Plast: Nejintenzivnější proužek z těchto médií. Detekuje bílkoviny v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 32 kDa. Není zde patrný vliv Wy-14643, ale pozitivní vliv plastu.

Kolagenní gel: Poměrně intenzivní proužek detekující bílkoviny v oblasti 36 kDa. Buňky nejsou Wy-14643 ovlivněny.

Fibrinový gel: Méně intenzivní proužek oproti buňkám kultivovaným na plastu a v kolagenním gelu. Je patrná exprese bílkovin v oblasti 33 kDa. Wy-14643, stejně jako v předchozím případě, neovlivňuje expresi bílkovin.

Z výsledků westernových blotů je zřejmé, že expresi proteinů ovlivňuje jak Wy-14643, tak i kultivační prostředí, v kterém byly MFB pěstovány.

Wy-14643 ovlivňovala pouze expresi bílkovin genu OPN, kde byly MFB kultivovány v trojrozměrném prostředí kolagenu a u PPAR- α , kde byly buňky kultivovány na polystyrenových Petriho miskách. V ostatních případech po přidání Wy-14643 nebyly detekována změna v expresi proteinů.

Jak už bylo zmíněno, expresi bílkovin ovlivňuje kultivační prostředí. U OPN na plastu a u MMP-9, kde byly MFB kultivovány ve fibrinovém gelu, nebyly detekovány žádné bílkoviny. Jinak byly bílkoviny exprimovány u všech genů ve všech médiích. Např. u PPAR- α byly bílkoviny výrazně exprimovány ve všech třech kultivačních prostředích.

Přesnost westernového přenosu není srovnatelná s dobře vyvinutými fyzikálně-chemickými metodami. Proto může docházet k odchýlkám mezi teoretickou a experimentálně zjištěnou molekulovou hmotností. Reprodukovatelnost výsledků se zvyšuje při použití stejného gelu (Weber, Osborn, 1969). Kromě toho se jaterní MFB mohou chovat jinak než klasické buňky.

DISKUSE

Obsahem této diplomové práce je sledování vlivu Wy-14643 na expresi genů a bílkovin v potkaních MFB. Wy-14643 je ligand PPAR- α , látka, která ovlivňuje metabolismus lipidů (Thieme et al., 2010). Tato syntetická látka ovlivňuje fibrinogenezi. Ve studii, při níž byla hlodavcům opakovaně podávána strava nedostatečná na cholin a methionin (MCD) docházelo k progresivní jaterní cirhóze. Podávání Wy-14643 po dobu 12-ti dnů vedlo ke snížení exprese jaterního kolagenu typu I, TIMP-1, TIMP-2 a MMP-13, zatímco exprese MMP-2 zůstala nezměněna. Wy-14643 potlačuje jaterní fibrózu vyvolanou jak MCD, tak i thiacetamidem (Ip et al., 2004; Toyama et al., 2004).

Jaterní MFB byly kultivovány jak běžným způsobem v dvourozměrném prostředí na polystyrenových Petriho miskách, tak i v trojrozměrném kolagenním a fibrinovém gelu. Trojrozměrné prostředí nahrazuje přirozené prostředí ve tkáni. Volba těchto kultivačních médií pro pěstování MFB a volba genů vychází z disertační práce Aleny Jiroutové (2011). Ve zmíněné práci bylo zjištěno, že v kolagenním gelu docházelo ke zvýšené expresi mRNA u OPN, MMP-9 a TGF- β 1, kdežto u MFB kultivovaných ve fibrinovém gelu byla hladina exprese těchto genů snižena. Hodnota exprese mRNA u MMP-2 byla v obou médiích téměř konstantní.

Naše práce navazuje na výsledky studie Petry Čevelové (2009), která sledovala časovou závislost působení Wy-14643 v koncentraci 100 μ M na jaterní MFB. Tyto buňky byly kultivované na plastu a v trojrozměrném kolagenním gelu. Byla sledována exprese genů ve třech časových intervalech, a to 6, 12 a 24 h. Nejvýraznější vliv na expresi genů jaterních MFB byl v případě 12-ti hodinové kultivace, a to zvýšením exprese metaloproteinás.

Diplomová práce Jana Šafky (2011) ukazuje koncentrační závislost působení Wy-14643 na jaterní MFB kultivované na plastových Petriho miskách a v trojrozměrném kolagenním gelu. Tato práce sledovala genovou expresi MFB, které byly vystaveny působení Wy-14643 v koncentracích 40, 100 a 250 μ M. Jako optimální koncentrace působení této látky se ukázala koncentrace 100 μ M, při níž došlo k výraznému zvýšení MMP-9.

Naše práce rozšiřuje předchozí experimenty. Na tyto práce navazuje sledování genové exprese mRNA u buněk ve fibrinovém gelu, ale i na úrovni bílkovin v MFB kultivovaných na plastru, v kolagenním a fibrinovém gelu. Podle výsledků Čevelové a Šafky jsme použili Wy-14643 o koncentraci 100 μ M a nechali jej působit na MFB 12 h.

První částí našeho pokusu bylo stanovení genové exprese pomocí RT-rt PCR, kde jsme sledovali vliv Wy-14643 na jaterní MFB kultivované v trojrozměrném fibrinovém gelu. Zjistili jsme, že hladina mRNA se po přidání Wy-14643 u všech 5-ti genů zvyšuje. Největší změna byla pozorována u OPN, kde se hladina mRNA zvýšila více než dvojnásobně. Tato změna byla na hranici statistické významnosti. Obdobná změna exprese byla zjištěna i u MMP-9. V tomto případě byla změna exprese nevýznamná stejně jako u genů PPAR- α , MMP-2 a TGF- β 1.

OPN je glykosylovaný a fosforylovaný protein, který se vyskytuje v tělních tekutinách a v ECM mineralizovaných tkání. Tento protein ovlivňuje adhezi, migraci buněk, zánětlivé reakce a inhibuje apoptózu. Exprese OPN se zvyšuje v místě poškození a stimuluje regeneraci tkáně. OPN se může vázat na kolagen typu I a fibronektin, čímž zvyšuje odolnost ECM. Interakcí s transkripčními faktory se může zvyšovat transkripce OPN (Denhardt, Noda, 1998). OPN aktivuje MMP-9 v buňkách hladkého svalstva (Li et al., 2007).

Se zvýšením OPN koreluje zvýšení metaloproteinasy MMP-9, jejíž množství se zvyšuje s akumulací MFB. MMP-9 se účastní resorpce a remodelace ECM. Degraduje především kolagen III a IV (Barascuk et al., 2010).

Růstový faktor TGF- β patří mezi profibrogenické cytokiny. Reguluje syntézu a remodelaci ECM, indukuje zvýšení α -SMA a stimuluje činnost inhibitorů proteas TIMP (Verrecchia, Mauviel, 2007). Dále ovlivňuje buněčné pochody jako růst, diferenciaci, proliferaci, migraci a apoptózu (Stalnikowitz, Weissbrod, 2003). TGF- β zvyšuje hladinu mRNA stejně jako expresi na úrovni bílkovin (Arora et al., 1999).

Druhou částí našeho experimentu bylo sledování exprese bílkovin pomocí westernového přenosu na nitrocelulosovou membránu. Studovali jsme nejen vliv Wy-14643, ale také vliv kultivačního prostředí, v němž byly MFB pěstovány. Buňky jsme kultivovali běžným způsobem na polystyrenových Petriho miskách a v trojrozměrném fibrinovém a kolagenním gelu. V předchozích pracích byla

studována pouze exprese na úrovni mRNA, proto jsme tyto experimenty rozšířili o expresi bílkovin.

Z výsledků westernových blotů vyplývá, že Wy-14643 ovlivnila pouze expresi proteinu OPN v MFB kultivovaných v prostředí kolagenního gelu a u PPAR- α , kdy byly buňky kultivovány na polystyrenových Petriho miskách. V případě ostatních genů nebyla po přidání Wy-14643 nalezena žádná změna v expresi proteinů. Vliv kultivačního prostředí je zřejmý u OPN na plastu a u MMP-9 při kultivaci buněk ve fibrinovém gelu, kde nebyly v buněčném lyzátu detekovány žádné bílkoviny. Jinak byly bílkoviny exprimovány u všech genů ve všech médiích.

V následujících odstavcích můžeme sledovat, jak hladina mRNA koreluje s expresí bílkovin. Porovnááme nejen naše hodnoty exprese mRNA u MFB kultivovaných na fibrinovém gelu, ale i výsledky vycházející ze studie Jana Šafky, který se zabýval expresí mRNA u MFB kultivovaných na plastu a v kolagenním gelu.

Hladina mRNA u OPN je při kultivaci v kolagenním gelu vyšší než na plastu, po přidání Wy-14643 se exprese na rozdíl od kultivace na plastu zvyšuje, ve fibrinovém gelu je hladina mRNA po přidání Wy-14643 zvýšená a tato změna je na hranici statistické významnosti. Genová exprese na úrovni bílkovin byla výrazně zvýšená v buňkách v gelech, především ve fibrinovém gelu, přičemž na plastu nebyly proteiny detekovány. Wy-14643 zvýšila expresi bílkovin jen u buněk kultivovaných v kolagenním gelu.

Genová exprese mRNA u receptoru PPAR- α byla stejná na plastu v kolagenním gelu, po přidání Wy-14643 se tato hladina nemění. V buňkách kultivovaných ve fibrinovém gelu se hladina mRNA po přidání studované látky zvyšuje. Exprese na úrovni bílkovin odpovídá výsledkům stanovení mRNA, Wy-14643 mírně zvyšuje expresi v MFB kultivovaných na plastu.

Hladina mRNA MMP-2 je vyšší v MFB kultivovaných v kolagenním gelu než na plastu, po přidání Wy-14643 zůstala nezměněna. V případě kultivace buněk ve fibrinovém gelu se po přidání látky exprese mRNA se mírně zvýšila. V buňkách pěstovaných v kolagenním gelu je patrné výrazné snížení exprese proteinů na rozdíl od exprese mRNA, což může být způsobeno možnou sekrecí enzymu do média. Fibrinový gel vykazuje vyšší hladinu bílkovin, vliv Wy-14643 nebyl pozorován v žádném z těchto médií.

Hladina genové exprese na úrovni mRNA u MMP-9 byla stejná na plastu i v kolagenním gelu, po přidání Wy-14643 se zvyšuje stejnou měrou. Po přidání sledované látky k MFB kultivovaným ve fibrinovém gelu došlo ke zvýšení hladiny mRNA. Exprese bílkovin byla nejvýraznější na plastu, v kolagenním gelu byla nízká a ve fibrinovém gelu nebyly proteiny detekovány vůbec. Stejně jako u předchozího genu Wy-14643 expresi bílkovin neovlivnila.

Hladina mRNA u růstového faktoru TGF- β 1 byla stejná na plastu i v kolagenním gelu. Po přidání Wy-14643 zůstala exprese mRNA nezměněná, u MFB kultivovaných ve fibrinovém gelu se mírně zvýšila. Genová exprese na úrovni bílkovin byla snížena v buňkách kultivovaných v gelech, studovaná látka expresi proteinů neovlivnila.

Genové exprese na úrovni transkripce nemusí odpovídat změnám v expresi bílkovin. Tento rozdíl je způsoben tím, že při vzniku bílkovin dochází k alternativnímu sestřihu a post-translačním modifikacím (Hannivoort et al., 2012). Vlivem post-translačních modifikací dochází ke zvýšení heterogenity bílkovin a může dojít i k odchýlkám od očekávaných molekulových hmotností (Jensen, 2004).

Z výsledků této diplomové práce je zřejmé, že Wy-14643 ovlivňuje expresi genů jaterních MFB. Změna exprese pro přidání této látky k MFB kultivovaných ve fibrinovém gelu je méně výrazná než ve zmíněných předchozích pracích, kde byly MFB kultivovány v kolagenním gelu. Exprese je ovlivněna především na úrovni mRNA, na úrovni bílkovin bílkovin jen minimálně.

ZÁVĚR

Naše práce sledovala změny exprese některých genů v jaterních MFB, které byly kultivovány na plastu, v trojrozměrném kolagenním a zejména fibrinovém gelu. Jaterní MFB hrají důležitou roli v procesu fibrogenese. Fibrin je jednou z bílkovin, které se v prvních fázích po poškození jater podílejí na jejich reparaci. Buňky byly ovlivňovány Wy-14643, jež je ligandem jaderných receptorů PPAR- α . U všech 5-ti sledovaných genů, receptoru PPAR- α , OPN, MMP-2, MMP-9 a TGF- β 1 došlo ke zvýšení exprese na úrovni mRNA. Největší změna byla pozorována u genu OPN a metaloproteinasy MMP-9. Na úrovni bílkovin se však vliv Wy-14643 projevil pouze u genu OPN, kde byly MFB kultivovány v trojrozměrném prostředí kolagenu a u PPAR- α , kde byly buňky kultivovány na polystyrenových Petriho miskách. Wy-14643 tedy ovlivňuje především genovou expresi na úrovni mRNA, expresi bílkovin ovlivňuje minimálně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABBOTT, B. D. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha, Beta, and Gamma mRNA and Protein Expression in Human Fetal Tissues. *PPAR Res.* 2010, vol. 2010, s. 1-19.
- ARORA, P. D. et al. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 1999, vol. 154, s. 871-882
- Asuragen, Inc. *Asuragen* [online] Austin (USA) [cit. 2011-11-22]. Dostupné z www: http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx
- BARASCUK, N. et al. A Novel Assay for Extracellular Matrix Remodeling Associated with Liver Fibrosis: An Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for a MMP-9 Proteolytically Revealed Neo-Epitope of Type III Collagen. *Clin. Biochem.* 2010, vol. 43, s. 899-904.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver Fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005, vol. 115, s. 209-218.
- BARONI, G. S. et al. Interferon Gamma Decreases Hepatic Stellate Cell Activation and Extracellular Matrix Deposition in Rat Liver Fibrosis. *Hepatology.* 1996, vol. 23, s. 1189-1199.
- BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver Extracellular Matrix in Health and Disease. *J. Pathol.* 2003, vol. 200, s. 504-515.
- BOJES, H. K. et al. Antibodies to Tumor Necrosis Factor α Prevent Increases in Cell Replication in Liver due to the Potent Peroxisome Proliferator WY-14,643. *Carcinogenesis.* 1997, vol. 18, s. 669-674.
- BRENNER, C. A. et al. Genes for Extracellular Matrix-Degrading Metalloproteinases and their Inhibitor, TIMP, are Expressed During Early Mammalian Development. *Genes Dev.* 1989, vol. 3, s. 848-859.
- BROWN, J. E. P. et al. Regulation of Beta-Cell Viability and Gene Expression by Distinct Agonist Fragments of Adiponectin. *Peptides.* 2010, vol. 31, s. 944-949.

- BURRIDGE, K. et al. Tyrosine Phosphorylation of Paxillin and pp12^{5FAK} Accompanies Cell Adhesion to Extracellular Matrix: A Role in Cytoskeletal Assembly. *J. Cell Biol.* 1992, vol. 119, s. 893-903.
- CALÈS, P. Apoptosis and Liver Fibrosis: Antifibrotic Strategies. *Biomed Pharmacother.* 1998, vol. 52, s. 259-263.
- CHEN, K. et al. Protective Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist, Wy14643, on Hypoxia/Reoxygenation Injury in Primary Rat Hepatocytes. *PPAR Res.* 2012, vol. 2012, s. 1-8.
- CORPECHOT, C. et al. Smoking as an Independent Risk Factor of Liver Fibrosis in Primary Biliary Cirrhosis. *J. Hepatol.* 2012, vol. 56, s. 218-224.
- CORTON, J. C. et al. Down-Regulation of Cytochrome P450 2C Family Members and Positive Acute-Phase Response Gene Expression by Peroxisome Proliferator Chemicals. *Mol. Pharmacol.* 1998, vol. 54, s. 463-473.
- ČEVELOVÁ, P. *Expres genů v jaterních fibroblastech kultivovaných v trojrozměrné matrix.* Pardubice 2009. 60 s. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická.
- DENHARDT, D. T.; NODA, M. Osteopontin Expression and Function: Role in Bone Remodeling. *J. Cell. Biochem.* 1998, vol. 72, s. 92-102.
- DESMOULIÈRE, A. et al. Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis. *Lab. Invest.* 2003, vol. 83, s. 1689-1707.
- DESMOULIÈRE, A. Hepatic Stellate Cells: The Only Cells Involved in Liver Fibrogenesis? A Dogma Challenged. *Gastroenterology.* 2007, vol. 132, s. 2059-2062.
- DOOLEY, S. et al. Transforming Growth Factor β Signal Transduction in Hepatic Stellate Cells via Smad2/3 Phosphorylation, a Pathway that is Abrogated During in Vitro Progression to Myofibroblasts: TGF β Signal Transduction During Transdifferentiation of Hepatic Stellate Cells. *FEBS Lett.* 2001, vol. 502, s. 4-10.
- DOOLEY, S. et al. Expression of Smads during in Vitro Transdifferentiation of Hepatic Stellate Cells to Myofibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, vol. 283, s. 554-562.

- DRANOFF, J. A.; WELLS, R. G. Portal fibroblasts: Underappreciated Mediators of Biliary Fibrosis. *Hepatology*. 2010, vol. 51, s. 1438-1444.
- EHRMANN, J.; HŮLEK, P. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. 590 s. ISBN 978-802-4731-186.
- FAN, L.-Q. et al. Opposing Mechanisms of NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase Regulation by Peroxisome Proliferators. *Biochem. Pharmacol.* 2003, vol. 65, s. 949-959.
- FRIEDMAN, S. L. Liver Fibrosis-From Bench to Bedside. *J. Hepatol.* 2003, vol. 38, s. 38-53.
- GEIGER, B. et al. Transmembrane Extracellular Matrix-Cytoskeleton Crosstalk. *Mol. Cell Biol.* 2001, vol. 2, s. 793-805.
- GELMAN, L. et al. Molecular Basis of Selective PPAR γ Modulation for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, vol. 1771, s. 1094-1107.
- GIZARD, F. et al. PPAR γ Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Underlying Intimal Hyperplasia by Inducing the tumor Suppressor p16^{INK4a}. *J. Clin. Invest.* 2005, vol. 115, s. 3228-3238.
- HANNIVOORT, R. A. et al. Genomics and Proteomics in Liver Fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012, vol. 5, s. 1-14.
- IGNOTZ, R. A.; MASSAGUÉ, J. Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* 1986, vol. 261, s. 4337-4345.
- IP, E. et al. Administration of the Potent PPAR- α Agonist, Wy-14,643, Reverses Nutritional Fibrosis and Steatohepatitis in Mice. *Hepatology*. 2004, vol. 39, s. 1286-1296
- IREDAE, J. P. et al. Mechanisms of Spontaneous Resolution of Rat Liver Fibrosis: Hepatic Stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors. *J. Clin. Invest.* 1998, vol. 102, s. 538-549.
- JENSEN, O. N. Modification-Specific Proteomics: Characterization of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, vol. 8, s. 33-41.

- JIROUTOVÁ, A. *Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů*. Hradec Králové 2011. 122 s. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- JIROUTOVA, A. et al. Expression of mRNAs Related to Connective Tissue Metabolism in Rat Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2007, vol. 58, s. 263-273.
- JUNQUEIRA, L. C. et al. *Základy histologie*. 7. vyd., v ČR 1. Jinočany: H & H, 1997. 502 s. ISBN 80-857-8737-7.
- KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Role of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis and the Reversal of Fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, vol. 22, s. 73-78.
- LAMOTTE, Y. et al. Synthesis and Biological Activities of Novel Indole Derivatives as Potent and Selective PPAR γ Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, s. 1399-1404.
- LI, C-F. et al. An Osteopontin-NADPH Oxidase Signaling Cascade Promotes Pro-Matrix Metalloproteinase 9 Activation in Aortic Mesenchymal Cells. *Circ. Res.* 2006, vol. 98, s. 1479-1489.
- MARX, N. et al. PPAR γ Activation in Human Endothelial Cells Increases Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression PPAR γ as a Potential Mediator in Vascular Disease. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 1999, vol. 19, s. 546-551.
- Molecular Station. *Molecular Station* [online] [cit. 2011-11-22]. Dostupné z www: <http://www.molecularstation.com/pcr/>
- MOODY, D. E.; REDDY, J. K. The Hepatic Effects of Hypolipidemic Drugs (Clofibrate, Nafenopin, Tibric Acid, and Wy-14,643) on Hepatic Peroxisomes and Peroxisome-Associated Enzymes. *Am. J. Pathol.* 1978, vol. 90, s. 435-446.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999, vol. 274, s. 21491-21494.
- OBERHAUSER, A. F. et al. The Molecular Elasticity of the Extracellular Matrix Protein Tenascin. *Nature.* 1998, vol. 393, s. 181-185.
- PAULSEN, D. F. *Histologie a buněčná biologie*. 1. vyd. Praha: H & H, 2004. 433 s. ISBN 80-731-9024-9.

- PÉREZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Discovery of Potent Dual PPAR α Agonists/CB1 Ligands. *ACS Med. Chem. Lett.* 2011, vol. 2011, s. 793-797.
- PETERS, J. M. et al. Role of PPAR α in the Mechanism of Action of the Nongenotoxic Carcinogen and Peroxisome Proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*. 1997, vol. 18, s. 2029-2033.
- POLI, G. Pathogenesis of Liver Fibrosis: Role of Oxidative Stress. *Mol. Asp. Med.* 2000, vol. 21, s. 49-98.
- POOLE, M. et al. Altered Expression of the Carboxylesterases ES-4 and ES-10 by Peroxisome Proliferator Chemicals. *Toxicology*. 2001, vol. 165, s. 109-119.
- PŘÍBRAMSKÁ, V.; HUSOVÁ, L. Jaterní cirhóza. *Interní med.* 2007, roč. 9, s. 486-489.
- QIN, L.; HAN, Y.-P. Epigenetic Repression of Matrix Metalloproteinases in Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells through Histone Deacetylases 4: Implication in Tissue Fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2010, vol. 177, s. 1915-1928.
- RAVAL, P. et al. Revisiting Glitazars: Thiophene Substituted Oxazole Containing α -Ethoxy Phenylpropanoic Acid Derivatives as Highly Potent PPAR α/γ Dual Agonists Devoid of Adverse Effects in Rodents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, s. 3103-3109.
- SETH, D. et al. Alcohol, Signaling, and ECM Turnover. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010, vol. 34, s. 4-18.
- SPORN, M. B. et al. Prospects for Prevention and Treatment of Cancer with Selective PPAR γ Modulators (SPARMs). *Trends Mol. Med.* 2001, vol. 7, s. 395-400.
- STALNIKOWITZ, D. K.; WEISSBROD A. B. Liver Fibrosis and Inflammation. *Ann. Hepatol.* 2003, vol. 2, s. 159-163.
- ŠAFKA, J. *Působení potenciálních léčiv na expresi genů v jaterních myofibroblastech.* Pardubice 2011. 58 s. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická.
- THIEME, T. M. et al. Rational Design of a Pirinixic Acid Derivative that Acts as Subtype-Selective PPAR γ Modulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, s.2469-2473.

- TOYAMA, T. et al. PPAR α Ligands Activate Antioxidant Enzymes and Suppress Hepatic Fibrosis in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, vol. 324, s. 697-704.
- TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada 2003. 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
- TSUKADA, S. et al. Mechanisms of Liver Fibrosis. *Clin. Chim. Acta.* 2006, vol. 364, s. 33-60.
- VERRECCHIA, F; MAUVIEL, A. Transforming Growth Factor- β and Fibrosis. *World J. Gastroenterol.* 2007, vol. 13, s. 3056-3062.
- WALLACE, K. et al. Liver Fibrosis. *Biochem. J.* 2008, vol. 411, s. 1-18.
- WEBER, K.; OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, vol. 244, s. 4406-4412.
- WOESSNER, J. F. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling. *Faseb J.* 1991, vol. 5, s. 2145-2154.
- ZÍTKA, O. et al. Elektrochemie jako nástroj pro studium interakce matrixové metaloproteinasy-9 a kolagenu. *Chem. Listy* 2009, roč. 103, s. 216-220.