

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Bakalářská práce

**Immunohistochemická detekce aktivace profibrotických
prekursorů v precizních jaterních řezech**

Adam Richter

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Mé poděkování patří RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Děkuji také všem pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd za příjemné pracovní prostředí.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

11. 5. 2023

Adam Richter

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Adam Richter

Školitel: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Název bakalářské práce: Immunohistochemická detekce aktivace profibrotických prekurzorů v precizních jaterních řezech

Orgánová jaterní fibróza je tou nejtypičtější progresí onemocnění u chronických zánětlivých onemocnění a celkově výrazně přispívá k celosvětové mortalitě bez ohledu na ostatní příčiny. Za jaterní fibrotické procesy jsou nejčastěji zodpovědné aktivované hvězdicové buňky (HSC), které se nacházejí v Disseho prostoru jater, přičemž mohou podléhat diferenciaci do formy myofibroblastů, které se poté významně podílí na tvorbě fibrotické tkáně. Pro pozorování aktivace a vývoje fibrotických procesů a jejich hodnocení se běžně využívá řady markerových genů a proteinů specifických právě pro tyto buňky.

Tato bakalářská práce byla věnována studiu detekce aktivace profibrotických prekurzorů v precizních jaterních řezech (PCLS). Bylo využito znázornění exprese vybraných proteinů v myších ultratenkých jaterních řezech. Sledována byla exprese desminu, gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) a α -aktinu hladkého svalstva (α SMA).

Řezy pro studium fibrózy byly inkubovány 48 hodin v základním Williamsově médiu obohaceném glukózou a s přídavkem gentamycinu na třepačce při 37 °C. Poté byly řezy fixovány 24-48 hodin ve 4% paraformaldehydu. Kontrolní řezy byly fixovány hned po odběru. Po fixaci byly tkáně zalité do parafínu a následně byly zhotovené parafínové řezy. Pro vyhodnocování bylo využito imunohistochemických barvicích technik (IHC) a standardního barvení hematoxylin-eosin.

Interpretace výsledků imunohistochemického barvení byla výrazně omezená přítomností nekrotického procesu po inkubaci PCLS 48 hodin. Exprese GFAP a desminu, která je charakteristická pro jaterní hvězdicové buňky, byla znázorněna

v podobě reprezentativních fotografií výsledného barvení IHC. Při hodnocení řezů s inkubací 48 hodin bylo možné vidět nespecifické zbarvení pozadí z důvodu nekrózy. V zachovalé tkáni nebyly pozorovány výraznější změny v expresi desminu ani GFAP. Exprese α SMA byla pozorována zejména ve stěně cév a portálních myofibroblastech v PCLS bez inkubace. Po inkubaci řezů bylo možné vidět zvýšení exprese α SMA, které může být znakem pro aktivaci HSC. Výsledky naší práce ukazují, že PCLS se po optimalizaci inkubace pro zachování viability tkáně, mohou stát užitečným a šetrným nástrojem pro studium poškození jater.

Klíčová slova: jaterní fibróza, hvězdicové buňky, desmin, α -aktin hladkého svalstva, gliální fibrilární kyselý protein, imunohistochemie, precizní jaterní řezy, profibrotické prekurzory

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Adam Richter

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Title of Bachelor thesis: Immunohistochemical evaluation of profibrotic precursors in precision cut liver slices

Organ hepatic fibrosis is the most typical disease progression in chronic inflammatory diseases and overall contributes significantly to worldwide mortality regardless of other causes. Activated hepatic stellate cells (HSC), which are found in the space of Disse in the liver, are most often responsible for liver fibrotic processes, and they can undergo differentiation into the myofibroblasts, which then significantly participate in the formation of fibrotic tissue. A number of marker genes and proteins specific to these cells are commonly used to observe the activation and development of fibrotic processes and their evaluation.

This bachelor's thesis was devoted to the study of the detection of activation of profibrotic precursors in precise cut liver slices (PCLS). The determination of the expression of selected proteins in mouse ultrathin liver sections was used. The expression of desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and α -smooth muscle actin (α SMA) was evaluated.

Sections for the study of fibrosis were incubated for 48 hours in basic Williams medium supplemented with glucose and gentamicin on a shaker at 37 °C. The sections were then fixed for 24-48 hours in 4% paraformaldehyde. Control sections were fixed immediately after preparation. After fixation, the tissues were embedded in paraffin and subsequently paraffin slices were made. Immunohistochemical staining techniques (IHC) and conventional hematoxylin-eosin staining were used for evaluation.

The interpretation of immunohistochemical staining results was significantly limited by the presence of a necrotic process after incubation of PCLS for 48 hours. The

expression of GFAP and desmin, which are characteristic for hepatic stellate cells, was shown in the form of representative photographs of the final IHC staining. A non-specific background staining due to necrosis could be seen in 48 hour incubation. No significant changes in the expression of desmin or GFAP were observed in the preserved tissue. α SMA expression was especially observed in the vessel wall and portal myofibroblasts in PCLS without incubation. After incubation of the slices, an increase in α SMA expression could be seen, which may be a sign for HSC activation. Our results show that after optimisation of incubation for tissue viability maintaining, these PCLS can become beneficial and gentle tool for liver damage studies.

Key words: liver fibrosis, stellate cells, desmin, α -smooth muscle actin, glial fibrillary acidic protein, immunohistochemistry, precise cut liver slices, profibrotic precursors

OBSAH

1. Úvod	9
2. Zadání – cíl práce	10
3. Teoretická část	11
3.1 Anatomie a morfologie jater	11
3.1.1 Anatomie	11
3.1.2 Morfologie jater	14
3.1.2.1 Hepatocyty	14
3.1.2.2 Orgány hepatocytu	15
3.1.2.3 Jaterní sinusoidy	17
3.1.2.4 Kupfferovy buňky	17
3.1.2.5 Hvězdicové Itovy buňky	18
3.2 Jaterní fibróza	21
3.2.1 Etiologie fibrózy	22
3.3 Ultratenké precizní jaterní řezy – precision cut liver slices (PCLS)	25
4. Metodická část	27
4.1 Materiál a chemikálie	27
4.1.1 Biologický materiál	27
4.2 Pracovní postupy	27
4.2.1 Příprava parafínových řezů	27
4.2.2 Barvení hematoxylin-eozin (HE)	29
4.2.3 Imunohistochemické barvení protilátkami	30
5. Výsledky	32
6. Diskuse	39
7. Závěr	42
8. Použité zkratky	43
9. Seznam obrázků	44
10. Použitá literatura	45

1. Úvod

Chronická onemocnění jater patří mezi hlavní celosvětové zdravotní problémy a mají na svědomí přibližně 2 miliony úmrtí ročně na celém světě. Základní etiologie chronického onemocnění jater zahrnují chronické onemocnění jater související s virem (hepatitida B a C), alkoholickou steatohepatitidu (ASH) a nealkoholickou steatohepatitidu (NASH), stejně jako autoimunitní a genetická onemocnění. Orgánová jaterní fibróza je tou nejcharakterističtější progresí onemocnění u chronických zánětlivých onemocnění a celkově výrazně přispívá k celosvětové mortalitě bez ohledu na ostatní příčiny. Vývoj fibrózy v játrech určuje především kvalitu života a také prognózu. Stupeň fibrózy tedy vzájemně souvisí s funkcí jater a představuje hlavní rizikový faktor pro rozvoj hepatocelulárního karcinomu (1).

Za jaterní fibrotické procesy jsou nejčastěji zodpovědné aktivované hvězdicové buňky, které se nacházejí v Disseho prostoru jater a tvoří zhruba desetinu všech přítomných buněk v jaterní tkáni. Tyto buňky diferencují do formy myofibroblastů, které jsou zdrojem velké masy extracelulární hmoty (ECM), která pak tvoří základ fibrotické tkáně. Pro pozorování aktivace a vývoje fibrotických procesů a jejich hodnocení jak z hlediska terapeutického, tak histologického, se využívá řady markerových genů a proteinů specifických právě pro tyto buňky (1).

Tato bakalářská práce se zabývá studiem detekce aktivace profibrotických prekurzorů v precizních jaterních řezech. Využívá se stanovení exprese vybraných proteinů v myších ultratenkých jaterních řezech. Sledována byla exprese desminu, gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) a α -aktinu hladkého svalstva (α SMA).

2. Zadání – cíl práce

Cílem bakalářské práce byla detekce aktivace profibrotických prekurzorů v precizních jaterních řezech. Sledovali jsme expresi desminu, gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP) a α -aktinu hladkého svalstva (α SMA).

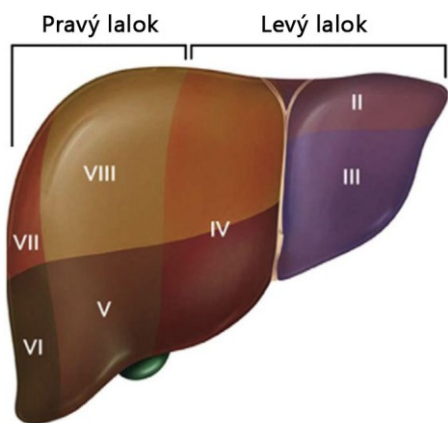
3. Teoretická část

3.1 Anatomie a morfologie jater

3.1.1 Anatomie

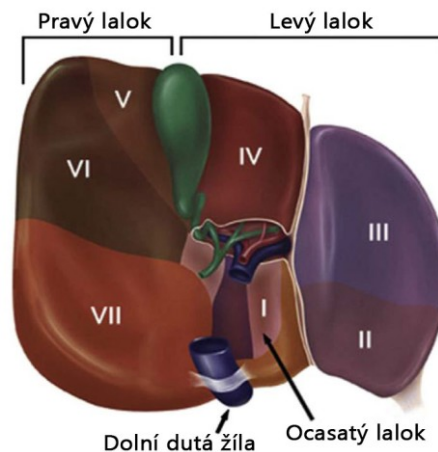
Játra jsou největší exokrinní žlázou a důležitým orgánem trávicího systému, představují přibližně 2 % až 3 % průměrné tělesné hmotnosti. Játra mají 2 laloky členěné do čtyř sektorů (přední, zadní, mediální a laterální), které bývají typicky popsány dvěma způsoby, morfologickou anatomí a funkční anatomí (jak je znázorněno na obr. 1 a 2), přičemž ten pravý je asi šestkrát větší než levý. Leží v pravém horním kvadrantu břišní dutiny pod pravou bránicí a jsou chráněna hrudním košem (2).

Při bližší analýze jaterních sektorů dochází k dalšímu rozdělení do segmentů (obr. 1 a 2). Pravý přední sektor obsahuje segmenty V a VIII; pravý zadní sektor, VI a VII; levý mediální sektor, IV; levý boční sektor, segmenty II a III (3).



Obr. č. 1 – Přední povrch jater

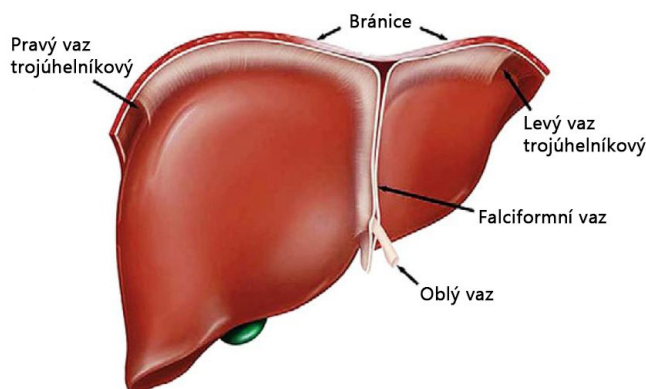
(Převzato a upraveno z: (2))



Obr. č. 2 – Zadní povrch jater

(Převzato a upraveno z: (2))

Působením nitrobřišního tlaku jsou schopna si udržet svou polohu. Tento tlak je přenášený tonem svalů břišní stěny a peritoneálními ligamenty, označovanými jako vazivové úpony (obr. 3). I když se nejedná o pravé vazy, jsou tato připojení avaskulární (2).



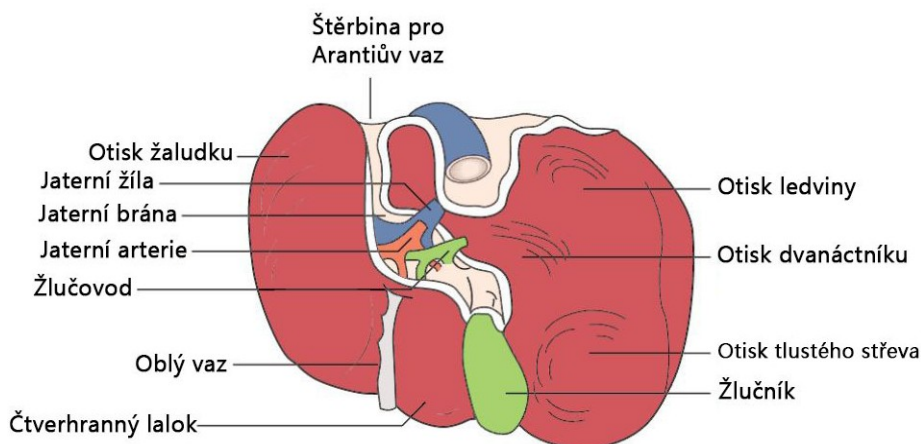
Obr. č. 3 – Vazivové úpony jater

(Převzato a upraveno z: (2))

Menšími segmenty pravého laloku jsou *lobus caudatus* (ocasatý lalok) na zadní ploše a *lobus quadratus* (čtverhranný lalok) na spodním povrchu. Pravý a levý lalok jsou v přední části jater odděleny záhybem pobřišnice nazývaným srpovitý (falciformní) vaz, vzadu štěrbinou pro *ligamentum venosum* a níže štěrbinou pro *ligamentum teres* (3).

Falciformní vaz je úpon vznikající na, nebo v blízkosti pupku a pokračuje na přední stranu jater v návaznosti na pupeční štěrbinu (2).

Arantiův vaz neboli *ligamentum venosum* je štíhlý zbytek pupeční žíly (*ductus venosus*) plodu, vychází z levé větve *vena portae* a poté navazuje a srůstá s *vena cava inferior* u vchodu levé jaterní žíly. Hlavní funkcí *ductus venosus* u plodu je odvádění většiny krevního toku z pupeční žíly přímo do dolní duté žíly a transportuje okysličenou krev z placenty k plodu. *Ligamentum teres* je oblý vaz, který je tvořen také jako zbytek pupeční žíly plodu, prochází na volném okraji falciformního vazů od pupku k dolní hranici jater a spojuje se s levou větví portální žíly. Portální žíla je doprovázena malými žilami, které ji spojují s ostatními žilami okolo pupku a jsou důležité, pokud dojde k ucpání žilního systému uvnitř jater (obr. 4) (3).



Obr. č. 4 – Pohled na játra ze spodu

(Převzato a upraveno z: (3))

Játra mají dvojitý krevní zásobení. Portální žíla přivádí žilní krev přímo ze střev a sleziny a jaterní tepna, která vychází z *truncus coeliacus*, zásobuje játra arteriální krví. Tyto cévy vstupují do jater štěrbinou zvanou *porta hepatis*, která leží na spodní ploše pravého laloku. Uvnitř štěrbiny se portální žíla i jaterní tepna větví a směřují do pravého a levého laloku. Vlastní jaterní kanál je pak vytvořen spojením pravého a levého jaterního žlučovodu (3).

Játra mají jak sympatickou, tak i parasympatickou nervovou inervaci. Nervová vlákna pocházejí zejména z celiakálního plexu, pravého bráničního nervu a dolních hrudních ganglií. Nervy bloudivého nervu se rozdělují na přední (levou) a zadní (pravou) větev, přičemž procházejí z hrudníku do břicha. Přední vagus se dělí na cefalickou a jaterní větev, z nichž právě tato prochází malou oponou a inervuje játra a je odpovědná za parasympatickou inervaci. Sympatická inervace vychází převážně z celiakálního plexu (2).

Játra jsou kromě tří míst zcela pokryta pobřišnicí. Přichází do přímého kontaktu s bránicí přes holou oblast ležící napravo od jamky pro dolní dutou žílu. Ostatní oblasti bez peritonea jsou jamky pro dolní dutou žílu a žlučník (3).

Žlučník leží v oblasti zahrnující část od dolní hranice jater k pravému konci *porta hepatis* (3). Jaterní vylučovací systém začíná žlučovými kanálky, jejichž povrch je tvořen stěnami sousedních hepatocytů. Povrch kanálků je utěsněn od zbytku mezibuněčného prostoru různými buněčnými spoji zahrnujícími *zonulae occludentes*, *nexy* a

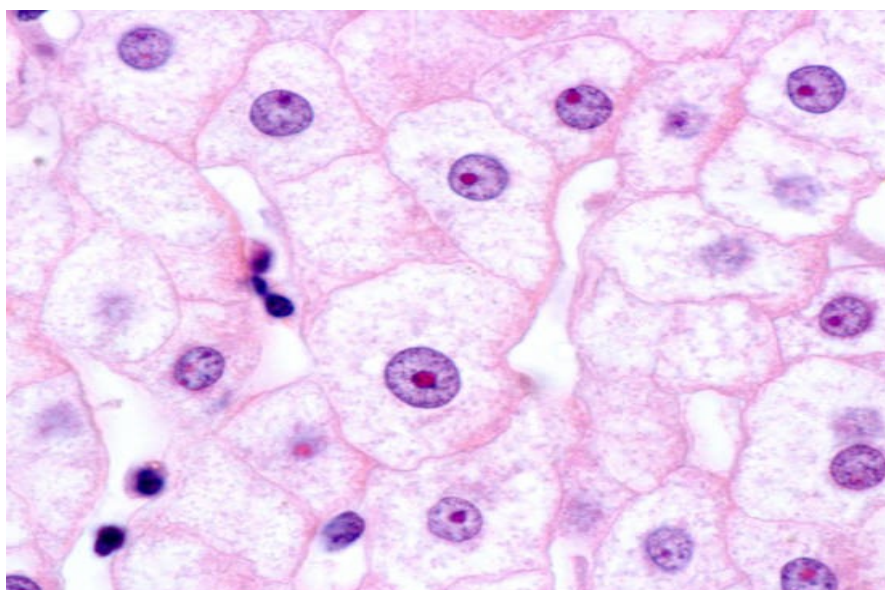
desmozomy. Intralobulární kanálkový systém přechází do tenkostěnných terminálních žlučvodů nebo kanálků vystlaných kubickým epitelem, které následně vyústí do větších interlobulárních žlučvodů v portálních prostorech (3).

3.1.2 Morfologie jater

3.1.2.1 Hepatocyty

Jaterní buňky (hepatocyty) tvoří asi 60 % jater. Jsou to útvary charakteristického polygonálního tvaru a mají přibližně 30 μm v průměru. Jednou z hlavních funkcí hepatocytů je produkce žluči, která je u člověka v průměru asi 15 ml/kg/den (4).

Jádro je jednoduché nebo méně často vícečetné a dělí se mitózou (obr. 5). Životnost jaterních buněk je přibližně 150 dní. Hepatocyt má tři povrchy: jeden směřuje k sinusoidě a Disseho prostoru, který se nachází mezi hepatocyty a sinusoidálními endotelovými buňkami. Druhý směřuje ke žlučovému kanálku a poslední k vedlejším hepatocytům. Nemají žádnou bazální membránu (3).



Obr. č. 5 – Jaterní buňky (hepatocyty) pod mikroskopem

(Převzato z: (5))

Okraj jaterních buněk je rovný až na místa s desmozomy. Z tohoto povrchu vyčnívají stejně velké a rozmístěné mikroklyky do lumen žlučových kanálků. Podél okraje sinusoid vyčnívají do peri-sinusoidálního tkáňového prostoru naopak nepravidelně

velké a rozmístěné mikrokly. Mikrovilózní struktura je charakteristická pro aktivní sekreci nebo absorpci, hlavně tekutin (3).

3.1.2.2 Organely hepatocytu

Jádro hepatocytu má dvojitou membránu s póry umožňujícími výměnu s okolní cytoplazmou. V chromatinové síti mají zabudováno jedno nebo více jadérek (3).

Mitochondrie také mají dvojitou membránu, přičemž vnitřní vrstva je invaginována pro tvorbu drážek nebo krist. Probíhá v nich obrovské množství procesů poskytujících energii, zejména těch, které zahrnují oxidativní fosforylaci. Obsahují mnoho enzymů, zejména enzymů citrátového cyklu a těch, které se účastní beta-oxidace mastných kyselin. Hlavní funkcí je schopnost transformovat energii a uvolňovat ji ve formě adenosintrifosfátu (ATP) (3).

Drsné endoplazmatické retikulum je útvar s vrstevnatou strukturou lemovanou ribozomy. Ty jsou zodpovědné za bazofilii pod světelným mikroskopem. Syntetizují specifické proteiny, zejména albumin, které se používají při srážení krve a enzymy jako je glukóza-6-fosfatáza. Triglyceridy se syntetizují z volných mastných kyselin a tvoří komplex s proteinem, který je vylučován exocytózou jako lipoprotein. Retikulum je také schopné účastnit se glykogeneze (3).

Hladké endoplazmatické retikulum tvoří tubuly a vezikuly. Obsahuje mikrosomy a je místem kde probíhá konjugace bilirubinu a detoxikace léků a mnoha cizorodých sloučenin. Jsou zde syntetizovány steroidy včetně cholesterolu a primárních žlučových kyselin, které jsou konjugovány s aminokyselinami glycinem a taurinem (3).

Peroxisomy jsou univerzální organely, které mají komplexní katabolickou a biosyntetickou roli a jsou rozšířeny v blízkosti hladkého retikula a granulí glykogenu. Jejich funkcí je především ochrana před účinky peroxidu vodíku či oxidace pro buňku škodlivých látek (3).

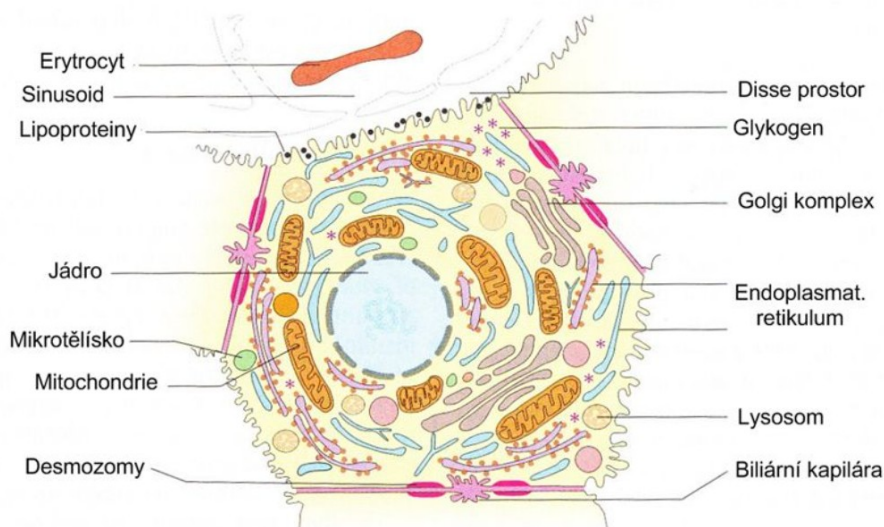
Lysozomy jsou membránové organely přiléhající k žlučovým kanálkům. Obsahují mnoho hydrolytických enzymů, které by při uvolnění mohly buňku zničit, proto jsou lysozomy vhodným prostředím pro degradaci různých typů organických látek (cukry, tuky, bílkoviny). Jsou schopné ničit organely se zkrácenou životností. Ukládají se zde

některé látky jako je feritin, lipofuscin, žlučový pigment či měď. Mohou u nich být pozorovány pinocytární vakuoly (3).

Golgiho aparát je charakteristický systém částic a váčků ležících v blízkosti kanálku. Celá tato skupina lysozomů, mikrotěles a Golgiho aparátu je prostředkem k oddělení jakéhokoli materiálu, který je požit a musí být vylučován nebo skladován pro metabolické procesy v cytoplazmě (3).

Hepatocyt drží při sobě cytoskelet skládající se z mikrotubulů, mikrofilament a intermediárních vláken. Mikrotubuly obsahují tubulin a jsou zodpovědné za subcelulární pohyblivost, pohyb vezikul a sekreci plazmatických proteinů. Mikrovlákna jsou tvořena aktinem, jsou kontraktilní a jsou důležitá pro integritu a pohyblivost kanálků a pro tok žluči. Intermediární filamenta jsou dlouhá rozvětvená filamenta zasahující do perinukleární oblasti a jsou zásadní pro stabilitu a prostorové uspořádání hepatocytu díky obsahu cytokeratinů (3).

Všechny tyto buněčné organely pak tvoří dohromady základní histologickou játerní buňku – polygonální hepatocyt (obr. 6). S věkem se počet hepatocytů snižuje a zvyšuje se hypertrofie, množství lysozomů a hladkého endoplazmatického retikula (4).



Obr. č. 6 – Schéma hepatocytu
(Převzato z: (6))

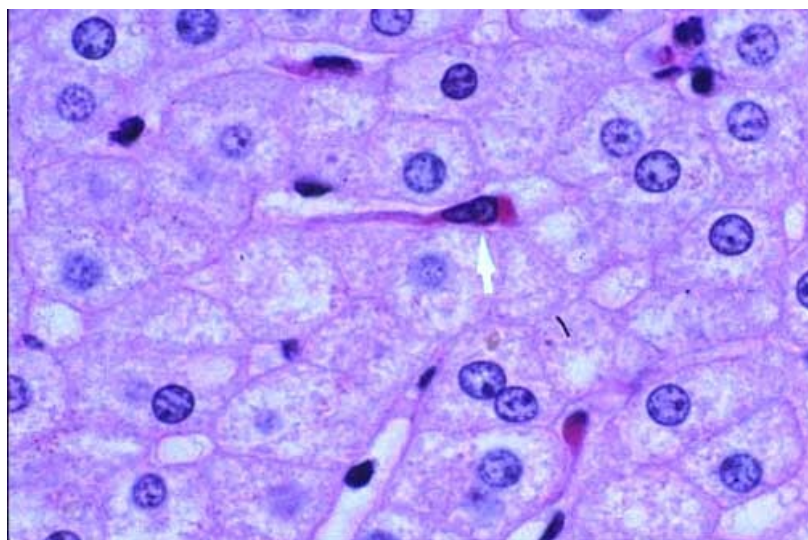
3.1.2.3 Jaterní sinusoidy

Jaterní sinusoidy jsou vystlány endotelovými buňkami. Endotelové buňky působí jako síto mezi sinusoidou a Disseho prostorem, mají specifickou a nespecifickou endocytotickou aktivitu s vysokou kapacitou a mají různé receptory. Jejich schopnost fungovat jako filtr je dána otvory zvanými fenestrae, které jsou seskupeny do síťových desek a filtrují makromolekuly různých velikostí mezi krví a plazmou v Disseho prostoru. Probíhá zde např. receptorem zprostředkovaná endocytóza pro několik molekul včetně transferinu, modifikovaného lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL) a lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL), jaterní lipázy a lipoproteinu s velmi nízkou hustotou (VLDL) (3).

Se sinusoidami jsou spojeny také buňky mononukleárního fagocytárního systému (Kupfferovy buňky) a jaterní hvězdicové buňky, které se také nazývají buňky Itovy. Oba typy tvoří významné funkční a histologické jednotky (3).

3.1.2.4 Kupfferovy buňky

Jedná se o vysoce mobilní makrofágy nacházející se v endotelové výstelce sinusoid, zejména v periportální oblasti. Pro klasické mikroskopické zvýraznění a hodnocení se barví peroxidázou nebo např. PAS-D barvením (obr. 7) Mají mikroklky a intracytoplazmaticky potažené vezikuly a denzní tělíska, která tvoří lysozomální aparát (3).



Obr. č. 7 – Kupfferovy buňky pod PAS-D barvením
(Převzato z: (7))

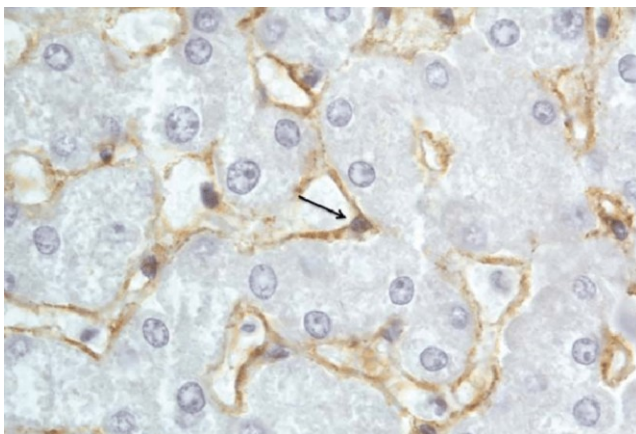
Kupfferovy buňky hrají zásadní roli ve vrozené imunitní odpovědi, jejich lokalizace v sinusoidě jim umožňuje účinně fagocytovat patogeny vstupující z portálního nebo arteriálního oběhu (8).

Tomu napomáhá několik procesů, včetně buněčného povrchu a receptorů komplementu. Potažení částice plazmatickým fibronectinem nebo opsoninem také usnadňuje fagocytózu, protože Kupfferovy buňky mají specifická vazebná místa pro fibronectin na svém povrchu. Buňky jsou také schopny vychytávat a zpracovávat oxidovaný LDL a odstraňují fibrin, např. u diseminované intravaskulární koagulace. Fagocytární kapacitu je schopen snižovat alkohol. Kupfferovy buňky jsou tak hlavní součástí tzv. mononukleárního fagocytárního systému (3).

Zatímco Kupfferovy buňky mohou být protektivní v řadě situací, včetně poškození jater vyvolaného léky a fibrózy vyvolané toxiny, změna jejich funkční aktivity je pak spojena s řadou chorobných stavů. Ve zdravých játrech se nachází v tzv. tolerogenním stavu. Je nezbytný k prevenci nežádoucích imunitních reakcí způsobených přichozím imunoreaktivním materiálem do jaterní sinusoidy, včetně materiálů pocházejících ze střeva a také antigeny přítomnými na mrtvých nebo umírajících buňkách, když jsou odstraňovány z oběhu v játrech. Za určitých chorobných stavů se však Kupfferovy buňky posouvají z tohoto tolerogenního fenotypu do patologicky aktivovaného stavu, který je charakteristický pro chronická zánětlivá onemocnění, včetně jaterní fibrózy (8).

3.1.2.5 Hvězdicové Itovy buňky

Buněčným typem, který je převážně zodpovědný za fibrotické procesy, jsou jaterní hvězdicové buňky (hepatic stellate cells, HSC), což je populace mezenchymálních buněk, která tvoří 5–10 % z celkového počtu buněk v játrech. Nacházejí se v Disseho prostoru a jsou obklopeny endotelovými buňkami a hepatocyty (obr. 8) (9).



Obr. č. 8 – Itovy buňky zvýrazněné imunoperoxidázovým barvením pod světelným mikroskopem

(Převzato z: (10))

Jejich hlavní funkcí je sekrece lamininu, proteoglykanů a kolagenu typu IV za vzniku struktur podobných bazální membráně. Buňky v klidovém stádiu jsou významné svou charakteristickou vlastností v ukládání vitamínu A (retinoidu) do cytoplazmy (11).

Při aktivaci hvězdicových buněk se tato vlastnost postupně ztrácí a buňky začnou proliferovat a podstupují trans-diferenciaci na kontraktilní myofibroblasty v reakci na stimulaci sousedními buňkami, včetně Kupfferových buněk, hepatocytů, krevních destiček, leukocytů a endotelových buněk. Přítomnost myofibroblastů je pak hlavním společným znakem u chronických fibroproliferativních onemocnění postihujících více orgánů, jako jsou plíce, ledviny a játra (9).

Proliferující myofibroblasty jsou klíčovým zdrojem velkého množství molekul extracelulární matrix jako je kolagen typu I a III a dalších proteinů, které tvoří patologické fibrózní tkáň. Zatímco Itovy buňky jsou hlavním fibrogenním buněčným typem v pericentrálních oblastech, portální myofibroblasty mohou převládat při poškození jater kolem portálních cest (12).

Aktivace hvězdicových buněk probíhá ve dvou hlavních fázích: iniciace a perpetuace. Iniciace se týká časných změn v genové expresi a fenotypu, díky nimž buňky reagují na jiné cytokiny a stimuly. Iniciace je většinou výsledkem parakrinní stimulace, primárně v důsledku změn v okolní extracelulární matrix, stejně jako expozice peroxidům a produktům poškozených hepatocytů. Perpetuace vyplývá z účinků těchto stimulů pro udržení aktivovaného fenotypu a generování fibrózy. Skládá

se z několika reakcí včetně proliferace, kontraktility, fibrogenese, degradace matrix, ztráty retinoidů a infiltrace zánětlivých buněk (13).

K aktivaci hvězdnicových buněk může dojít několika různými mechanismy. Nejčastěji jsou progresivní fibrotická onemocnění jater doprovázena chronickým poškozením epitelových buněk, tj. hepatocytů a cholangiocyty (epitelové buňky žlučových vývodů). Různé způsoby buněčné smrti (apoptóza, nekróza apod.) spouštějí reakce buněčné smrti v závislosti na etiologii onemocnění. Smrt hepatocytů zprostředkovaná imunitními buňkami je společným znakem jaterní fibrózy související s hepatitidou B a C, která zahrnuje profibrogenní zánětlivé chemokiny a jejich receptory. Některé zánětlivé mediátory vzniklé fagocytózou buněk, jako jsou tumor nekrotizující faktor (TNF), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), reaktivní formy kyslíku (ROS), mohou přispívat k zahájení aktivace Itových buněk. Dále může docházet k aktivaci imunitní regulací či již výše zmíněnou změnou extracelulární matrix vedoucí k jizvení a fibróze (11).

Při změnách ve fenotypu hvězdnicových buněk dochází během iniciace a udržování fibrózy k metabolickým změnám a to jak ke změnám metabolismu retinolu tak i například lipidů, uhlíku či dusíku (9).

Řada markerových genů a proteinů specifických pro Itovy buňky, včetně gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP), receptoru nervového růstového faktoru (p75), desminu, lecitin-retinolacyltransferázy (LRAT), kolagenu typu I, α -aktinu hladkého svalstva (α SMA), cytoglobinu a mnoha dalších, je využívána pro jejich histologickou detekci, genetické cílení, buněčné sledování osudu, terapeutické cílení a zobrazování (11).

3.2 Jaterní fibróza

Jedná se o komplexní fibrogenní a zánětlivý proces, který je důsledkem chronického poškození jater a představuje raný krok v progresi jaterní cirhózy. Cirhóza je celosvětově závažným zdravotním problémem kvůli nedostatku účinných léčebných metod (14).

Procesy po poškození jater zahrnují akutní a chronickou reakci. Pokud akutní poškození jater není závažné, sousední dospělé hepatocyty jsou schopny regenerovat a nahradit apoptotické a nekrotické buňky. Jestliže proces přetrvává, dochází ke kontinuální akumulaci extracelulární matrix extrémně bohaté na kolagen I a III, což nevyhnutelně vede k jizvení a fibróze jater (15).

V patogenezi jaterní fibrózy hraje ústřední roli zejména aktivace jaterních hvězdicových buněk. Časně poškození jater podporuje sekreci fibronektinu sinusoidálními endotelovými buňkami, což má aktivační účinek na HSC. Aktivace Kupfferových buněk navíc usnadňuje aktivaci Itoových buněk sekrecí TGF- β a ROS v extracelulárním prostředí (15). Také destičkový růstový faktor (PDGF), produkováný makrofágy a hvězdicovými buňkami je důležitým faktorem při rozvoji orgánové fibrózy, hraje zásadní roli v proliferaci, migraci a přežívání myofibroblastů. Jeho hladiny jsou tedy ve fibrotické tkáni zvýšené (16).

Pokud se tento stav neléčí, může se vyvinout v cirhózu a následnou portální hypertenzi, jaterní encefalopatii nebo selhání jater a vést ke zvýšenému riziku hepatocelulárního karcinomu, který může v konečném důsledku způsobit selhání orgánů a smrt. Mezi hlavní klinické komplikace jaterní cirhózy pak patří selhání ledvin, ascites, krvácení z varixů a jaterní encefalopatie (12).

Jaterní biopsie je považována za zlatý standard pro hodnocení jaterní fibrózy. Histologické vyšetření je užitečné pro identifikaci základní příčiny onemocnění jater a posouzení stupně nekrózy, zánětu a stádia fibrózy (12). Transplantace jater je v současnosti považována za jedinou léčebnou metodu cirhózy a je obecně nedostatečná (14). K vyšetření fibrózy je nezbytným předpokladem odstranění poškozujícího agens. Ukázalo se, že aktivace hvězdicových buněk je rozhodující pro rozvoj fibrózy, zatímco při zotavení fibrózy se počet aktivovaných buněk snižuje. K tomu může dojít v důsledku

reverte do klidové formy nebo apoptózou. Návrat do klidové formy může nastat pouze *in vitro*. Apoptóza byla však stanovena jako hlavní mechanismus pro odstranění aktivity těchto buněk, která probíhá spontánně *in vitro* (17).

3.2.1 Etiologie fibrózy

Nejčastějšími příčinami jaterní fibrózy jsou infekce virovou hepatitidou B (HBV) a C (HCV), nealkoholické ztučnění jater (NAFLD), alkoholické onemocnění jater (ALD) spojené se zneužíváním alkoholu, schistosoma a cholestatické a autoimunitní onemocnění jater. Méně častým, ale závažným chronickým onemocněním je schistosomóza, které se vyskytuje u lidí žijících v endemických oblastech v důsledku značné fibrózy způsobené nahromaděním parazitických vajíček (14).

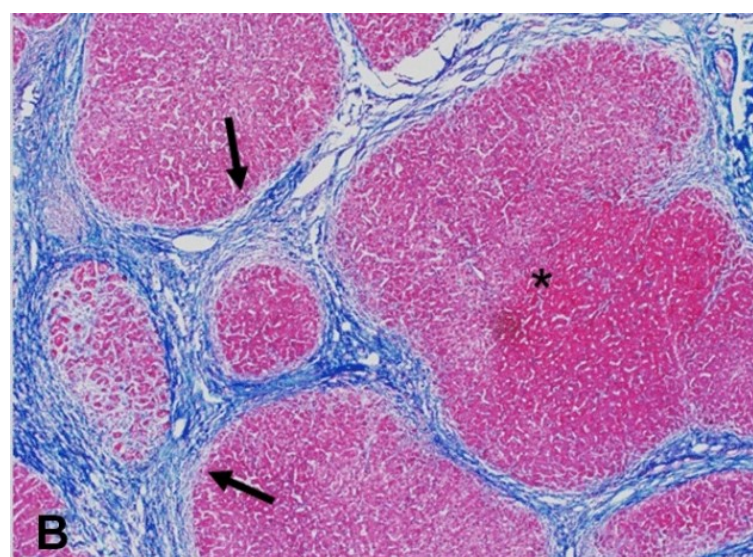
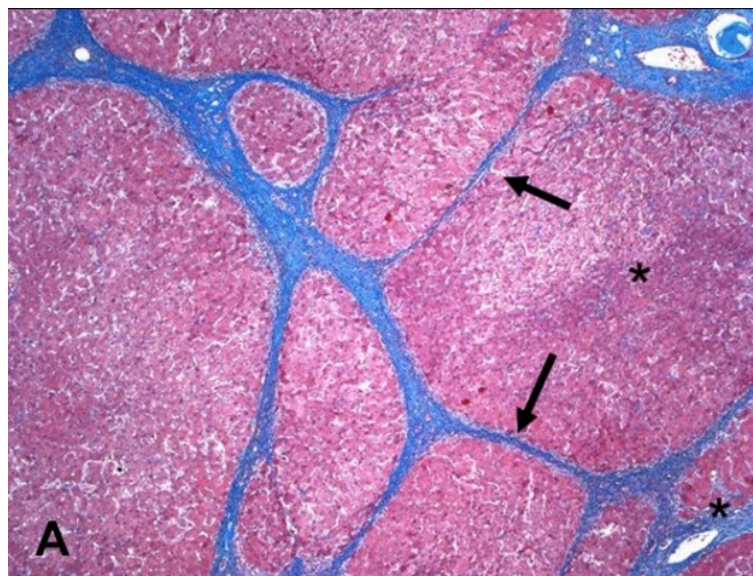
Virové infekce vyvolávají zánět jater, a tím přispívají k cyklickému procesu zánětu, nekróze a regeneraci. V místě zánětu dochází k nepřetržité infiltraci imunitních buněk a produkci zánětlivých cytokinů s následným poškozením jater, což spouští progresivní kaskádu rekonstrukce jaterního lalůčku, která podporuje jaterní fibrózu a cirhózu. Velice častou příčinou, která může vést k fibróze jater je nadměrné užívání alkoholu způsobující ALD. Většina pacientů je obecně asymptomatická a ALD je snadno reverzibilní, pokud se od konzumace alkoholu upustí (14).

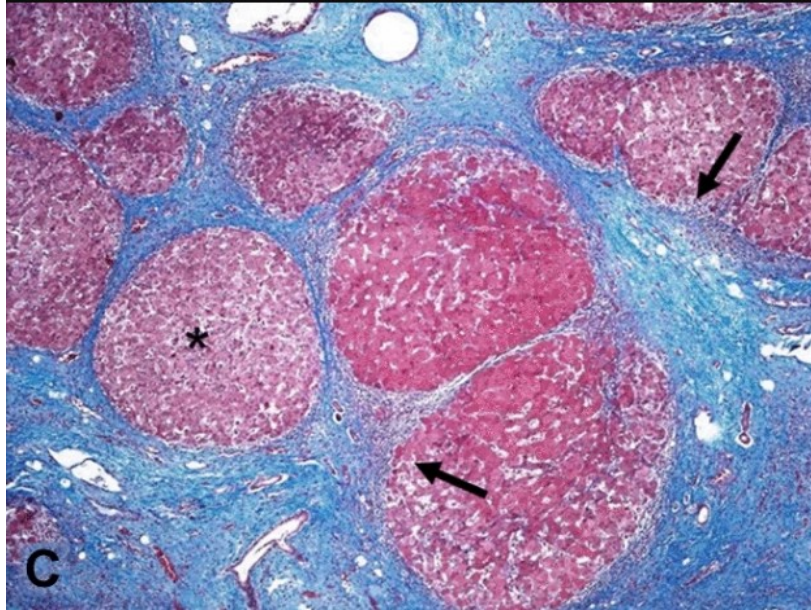
Nealkoholická steatohepatitida (NASH) je relativně časté chronické onemocnění jater s histologickými charakteristikami podobnými ALD. NASH se v jaterních biopsiích projevuje jako hepatocelulární poškození s nebo bez jaterní fibrózy a je jakýmsi mezistádiem mezi NAFLD a cirhózou. Většinou nastává, když dlouhodobý oxidační stres brání proliferaci zralých jaterních buněk, což vede k nadměrné nekróze a růstu jaterních progenitorových buněk. Kromě toho zánětlivá reakce na buněčnou nekrózu indukuje progresivní uvolňování růstového faktoru odvozeného z krevních destiček, TGF- β , TNF a dalších zánětlivých faktorů, jako je interleukin IL-1. Tyto zánětlivé signály vedou k aktivaci a proliferaci HSC a indukují diferenciaci HSC na myofibroblasty (14).

Jaterní fibróza, která je charakterizována nadměrným ukládáním extracelulárních proteinů, zahrnuje jak parenchymální, tak neparenchymální jaterní buňky, stejně jako infiltrující imunitní buňky. Kromě toho mohou různé orgány, jako je tuková tkáň, žlučovody, střevo a svaly, také ovlivnit rozvoj jaterní fibrózy. Ve fibróze má důležitou

roli také několik základních signálních drah. Komplexní interakce mezi těmito signálními cestami, různými buňkami a různými orgány přispívají k progresi jaterní fibrózy (14).

Cirhóza jater je konečným patologickým výsledkem různých chronických onemocnění jater a fibróza je právě hlavním prekurzorem. I když jsou příčiny jaterní cirhózy různé, existují některé patologické charakteristiky, které jsou společné všem případům jaterní cirhózy, včetně degenerace a nekrózy hepatocytů, nahrazení jaterního parenchymu fibrotickými tkáněmi a regeneračními uzly a ztráta funkce jater (obr. 9). V současnosti stále chybí či nejsou dokonalé účinné metody pro léčbu jaterní cirhózy, částečně kvůli špatnému pochopení jednotlivých mechanismů s následkem cirhózy (18).





Obr. č. 9 Tři stádia cirhózy hepatitidy C vykazující různé stupně ukládání fibrózy - regenerační uzly (hvězdička) a fibrotické pásy (černé šípky)
(Převzato z: (19))

3.3 Ultratenké precizní jaterní řezy – precision cut liver slices (PCLS)

Precizně řezané plátky jater představují robustní a všestranný *ex vivo* model, který si zachovává komplexní a mnohobuněčnou histologickou strukturu jaterního prostředí. Takové řezy jsou ideálním nástrojem pro zkoumání mechanismů poškození jater a pro identifikaci nových terapeutických cílů. Řezy jater jsou jednoduše reprodukovatelné, levné a schopné udržovat životaschopnost hepatocytů, Kupfferových, endotelových a jaterních hvězdicových buněk po dobu 5 dnů až 15 dnů při dodržení správných podmínek kultivace. Tkáň pro přípravu PCLS se obvykle získává z částečné hepatektomie, explantované tkáně nebo netransplantovatelné tkáně. Plátky jater mohou být také vyrobeny z postižených jater u pacientů s těžkou fibrózou a cirhózou. K získání řezů nádoru lze také použít resekovanou maligní jaterní tkáň (20).

PCLS se používaly hlavně ke studiu metabolisme sloučenin nebo ke zkoumání toxických účinků léků a sloučenin se zaměřením na smrt buněk hepatocytů (21). PCLS jsou však v dnešní době vhodným systémem pro *ex vivo* studium jaterní fibrózy a přinášejí několik zjevných výhod, včetně snadnější a rychlejší molekulární a genetické manipulace, zkrácení doby experimentů a snížení nákladů ve srovnání s experimenty na zvířatech. Dále pro přípravu nejsou nutné žádné proteolytické enzymy a v řezech je tak zachována normální polarita buněk. Udržují mnoho komplexních a buněčných interakcí, ke kterým dochází *in vivo* (22).

V neposlední řadě testovací systémy *ex vivo* a *in vitro* omezují počet zvířat používaných při pokusech a nahrazují pokusy na zvířatech alternativními metodami, takže výzkum na živých zvířatech nemusí být nezbytný kromě závěrečných fází preklinického vývoje. Tímto způsobem mohou různá propojení *ex vivo* a *in vitro* systémů s omezeným *in vivo* testováním významně přispět k pokroku v realizaci tzv. principu 3R, tj. nahrazení, snížení počtu a zjemnění podmínek (replacement, reduction, refinement) testování na živých zvířatech pro výzkum (22).

Běžně používaná tloušťka PCLS je 250 μm , protože to umožňuje plný přístup a přísun živin a kyslíku do vnitřních vrstev buněk, což by bylo narušeno, pokud by řezy byly tlustší než 300 μm . V případě potřeby však mohou být řezy tenké až 100 μm . Tloušťka řezu je důležitá pro zajištění dobré kvality, protože tenčí řezy by měly za

následek nízkou míru životaschopnosti, protože poměr poškozených a nepoškozených buněk by byl příliš velký (21).

Řezy připravené ze zdravých a fibrotických jater lze použít pro vyšetřování časně i pozdní fáze jaterní fibrózy. Jsou pak zvláště zajímavé pro zkoumání různých mechanismů zapojených do indukce a reverze fibrózy. Proto představují nejspolehlivější nástroj pro modelování a zkoumání drah, které jsou základem chronického onemocnění jater *in vitro* (21).

4. Metodická část

4.1 Materiál a chemikálie

4.1.1 Biologický materiál

Precizní jaterní řezy (150 μm) z myších jater byly zhotoveny a dále inkubovány na Katedře biochemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Práce se zvířaty byla prováděna v souladu se Zákonem č.246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a pod dohledem Odborné komise Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty pro zajišťování dobrých podmínek pokusných zvířat.

Kontrolní řezy (n=10) byly ihned po zhotovení umístěny do 4% paraformaldehydu a fixovány 24-48 hodin. Řezy pro studium fibrózy (n=10) byly inkubovány 48 hodin v základním Williamsově médiu obohaceném glukózou a s přídavkem gentamycinu na třepačce při syčení 85 % O₂ a 5 % CO₂ při 37 °C. Poté byly řezy fixovány 24-48 hodin ve 4% paraformaldehydu. Po fixaci byly tkáně zalité do parafínu a následně byly zhotovené parafínové řezy.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava parafínových řezů

ZALITÍ DO PARAFÍNU

Příprava tkání pro zalití do parafínu proběhla v autotechnikonu Leica.

Odvodnění tkáně

Parafín je médium nemísitelné s vodou, proto je třeba tkáň před zalitím odvodnit. Tkáň proto provedeme alkoholovou řadou lázní (je nutné brát v úvahu velikost tkáňových bločků – čím větší, tím delší doba v lázni). Začínáme lázní etanolu s koncentrací 70% a pokračuje se lázní s 80% a 96% koncentrací.

Projasnění

Po odvodnění je nutné projasnění tkáňových bločků. Tkáňové bločky byly ponechány v benzenových a xylenových lázních. Tkáň se díky benzenu a xyleny postupně projasní, někdy až zprůsvitní.

Prosycení parafínem

Před vlastním zalitím do čistého parafínu je nutné ještě tkáň prosytit parafínem.

Vlastní zalití do parafínu

Tkáňové bločky prosycené parafínem se zalévají do čistého parafínu.

- na dno vhodné formičky (dle velikosti tkáně) nalejeme malé množství parafínu
- tkáň zorientujeme a vložíme do parafínu (řezná plocha, hrana)
- tkáň necháme částečně zatuhnout (tkáň přilne na dno)
- přikryjeme označenou kazetou a dolijeme parafínem
- po zchladnutí z formiček odebereme kazetu se zalitou tkání, očistíme od přebytečného parafínu

Postup krájení parafínových řezů:

Pro krájení PCLS jsme použili automatický diskový mikrotom Leica DSC1. Na mikrotom byl upevněn žiletkový nůž pro krájení a následně jsme jej zajistili. Po zapnutí mikrotomu jsme kazetku s parafínovým bločkem upevnili do svěráku Neapolské svorky diskového mikrotomu. Mikrotom jsme přitom nechali kalibrovat. Přístroj sám nastavil pozici nože a parafínového bločku, abychom dosáhli jeho povrchu. Mikrotom před krájením je nutné odaretovat. Parafínový bloček se zalitou tkání jsme postupně zkrajovali, dokud jsme nedosáhli povrchu vlastní jaterní tkáně. Po správném zkrojení se dostáváme k vlastnímu krájení ultratenkých jaterních řezů. Pomocí tlačítek na manipulačním panelu pro ovládání mikrotomu jsme nastavili tloušťku řezu na požadovaných 4,5 μm . Řezy je nutné krájet velice opatrně, aby nedošlo k jejich poškození či znehodnocení. Jaterní řezy jsme pomocí skalpelu nebo pinzety přenesli na podložní sklíčka do kapky destilované vody. Zhotovené preparáty jsme odkládali na předem rozehřátou ploténku k napnutí a zafixování řezů. Po vysušení roztoku byly řezy

pevně přilepené na podložním skle a bylo možné s nimi manipulovat v květech pro další procesy - barvení řezů. Nakrájené a vysušené řezy je možné před barvením skladovat.

4.2.2 Barvení hematoxylin-eozin (HE)

Barvení hematoxylin-eosinem je základní a nejpoužívanější histologické barvení, které slouží k odlišení základních buněčných součástí a které poskytuje základní obraz lékařům o možné diagnóze pacienta. Je přehledné a používá se běžně na většinu materiálů v histologické laboratoři. Pokud v tomto barvení nalezneme podezření na diagnózu, můžeme poté tkáň zpracovat s jiným selektivním barvením pro bližší vyšetření. Velice často se využívá v kombinaci s imunohistochemickým vyšetřením.

Postup barvení

Praktické provedení barvení hematoxylin-eosin je poměrně rychlé a snadné. Využili jsme sady několika lázní určených pro vlastní barvení. Prvním krokem bylo odparafínování řezů. Sklíčka s jaterními řezy jsme umístili nejprve do 3 xylenových lázní, ve kterých jsme je nechali po dobu 5 minut. Následně jsme sklíčka provedli alkoholovou řadou. Postupně jsme sklíčka nechali v 96% etanolu, 80% etanolu a 70% etanolu vždy po dobu 5 minut. Z alkoholové řady jsme přemístili sklíčka do destilované vody opět na 5 minut a poté sklíčka otřeli. Dalším krokem bylo vlastní barvení. Sklíčka jsme umístili do lázně s hematoxylinem na dobu 6-8 minut a poté pod tekoucí pramenitou vodou jsme sklíčka nechali modřit. Sklíčka jsme opět otřeli a poté umístili do lázně s eosinem na 2 minuty a lehce opláchli destilovanou vodou. Pro odvodnění preparátů jsme nejdříve sklíčka 2x lehce opláchli v 96% etanolu. Následně jsme umístili sklíčka do směsné lázně etanolu s xylenem (2:1) po dobu 3 minut a také do lázně etanolu s xylenem (1:2) opět po dobu 3 minut. Předposledním krokem bylo projasnění, které jsme provedli umístěním sklíček do 3 lázní xylenu vždy po dobu 3 minut. Připravené sklíčka jsme poté jemně otřeli a následně zamontovali do montovacího média Eukitt a přikryli krycím sklíčkem. Takto obarvené jaterní řezy byly připravené pro pozorování pod mikroskopem.

4.2.3 Imunohistochemické barvení protilátkami

Imunohistochemie (IHC) je využívána jako metoda, která je založena na specifické vazbě mezi protilátkou a antigenem, k detekci a lokalizaci specifických antigenů v buňkách a tkáních, nejčastěji vyšetřovaných světelným mikroskopem.

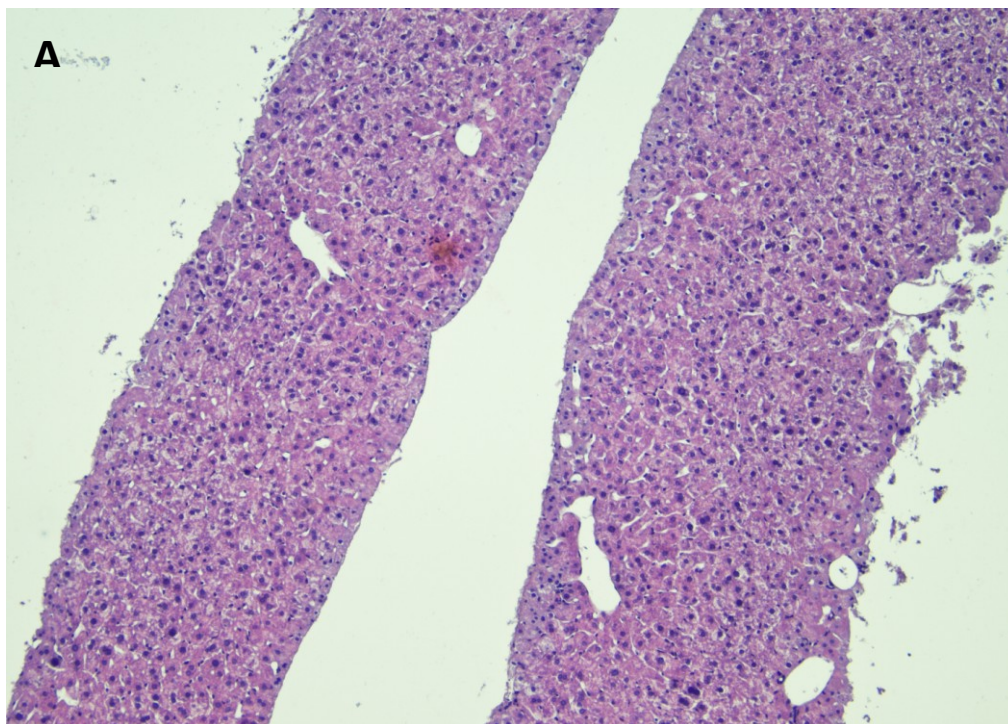
Pracovní postup:

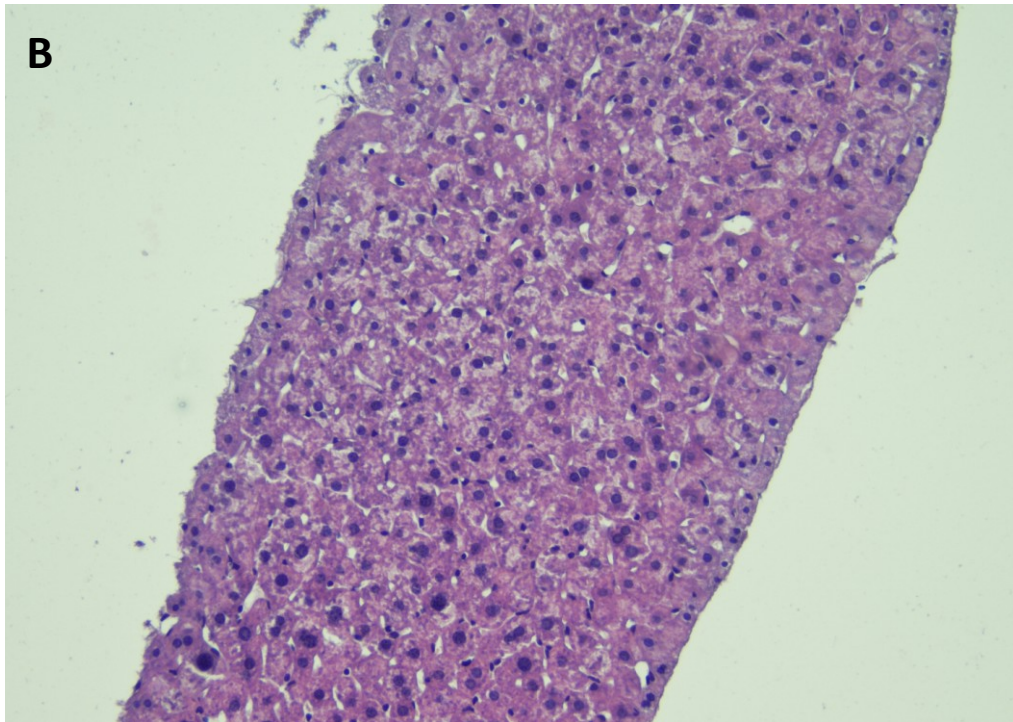
Prvním krokem bylo běžné odparafínování. Připravená sklíčka jsme provedli xylenovou řadou a poté alkoholovou řadou stejným způsobem jako u barvení hematoxylin-eosin. Sklíčka jsme poté umístili do PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok) po dobu 5 minut. Provedli jsme permeabilizaci řezů v 0,1% Tritonu v PBS po dobu 2 minut, která je nutná pro prostup protilátek přes lipidové membrány. Sklíčka jsme přemístili do PBS na 2 minuty. Sklíčka jsme poté nechali v kyvetě s citrátovým puforem vařit 20 minut pro odhalení antigenních epitopů. Kyvetu se sklíčky jsme nechali zchladnout a následně jsme řezy opláchli destilovanou vodou. Sklíčka jsme opět umístili do PBS (2x 5 min). Mezitím jsme si připravili roztok 3 % H₂O₂. Pomocí DAKO PEN jsme okolo vlastního řezu vytvořili bariéru proti tekutinám a aplikovali jsme 3% H₂O₂ (5 min). Preparáty jsme poté umístili opět do roztoku PBS (5 min). Připravili jsme blokovací roztok 5% mléka (0,5 g sušeného odtučněného mléka + 10 mL PBS) a následně jej aplikovali na dobu 1 hodiny. Pro přípravu primární protilátky jsme využili: pro **Desmin (PA5-16705)** a **αSMA (ab124964)** ředění - 1:100 (v 5% mléku), pro **GFAP (PA5-16291)** ředění – 1:50 (v 5% mléku). Po aplikaci protilátky jsme nechali řezy přes noc při 4 °C zavřené v boxu s vlhčenou buničinou. Řezy jsme opláchli v 0,05% Tweenu v PBS (500 mL PBS + 250 uL Tween) (5 min) a poté opět vložili do kyvety s PBS (2x 5 min). Sekundární protilátku jsme aplikovali po dobu 30 minut a připravili jsme avidin-biotin komplex ABC (5 mL PBS + 1 kapka A + 1 kapka B) (k použití od 30 min do 2h od doby přípravy). Řezy jsme opláchli v 0,05% Tweenu v PBS (5 min) a opět ponechali v PBS (2x 5 min). Následně jsme aplikovali na řezy ABC po dobu 30 minut. Mezitím co jsme připravovali DAB (3,3'- diaminobenzidin) jsme sklíčka nechali v kyvetě s PBS (2x 5 min). Na jaterní řezy jsme aplikovali DAB: 6 min (Desmin), 8 min (GFAP, αSMA). Sklíčka jsme nechali odstát 5 minut v destilované vodě a poté jsme je přesunuli do hematoxylinové lázně (45 s) a pod tekoucí kohoutkovou vodu proběhla diferenciac

buněčných jader (5 min). Předposledním krokem bylo odvodnění, kdy jsme řezy provedli acetonovou lázní až po xylen, načež navazovala samotná montáž do Eukittu.

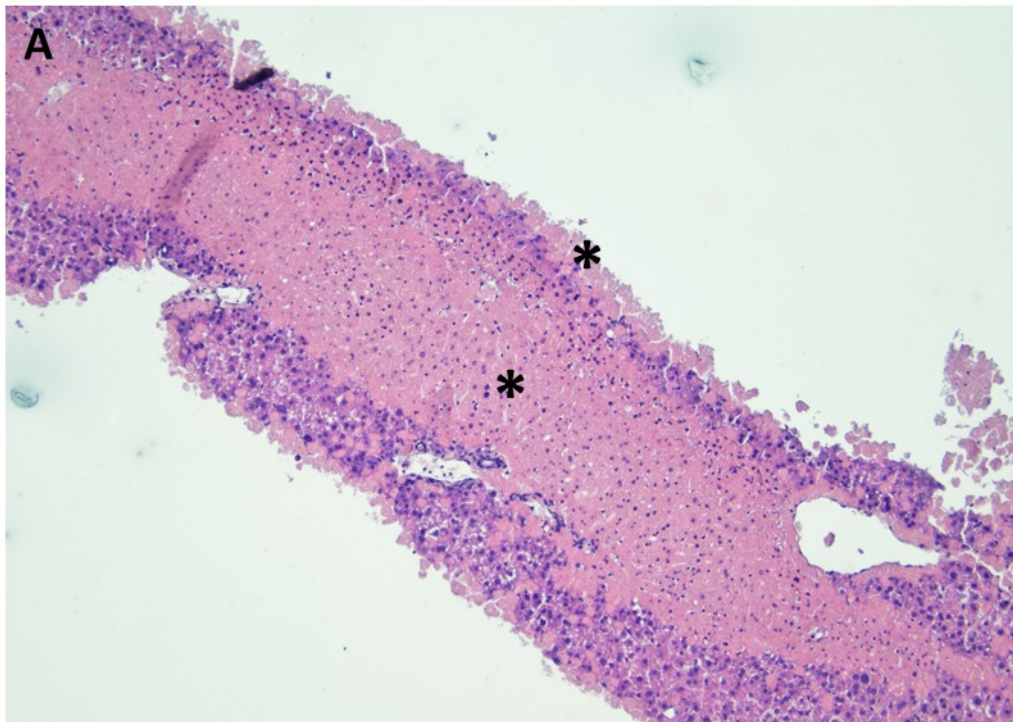
5. Výsledky

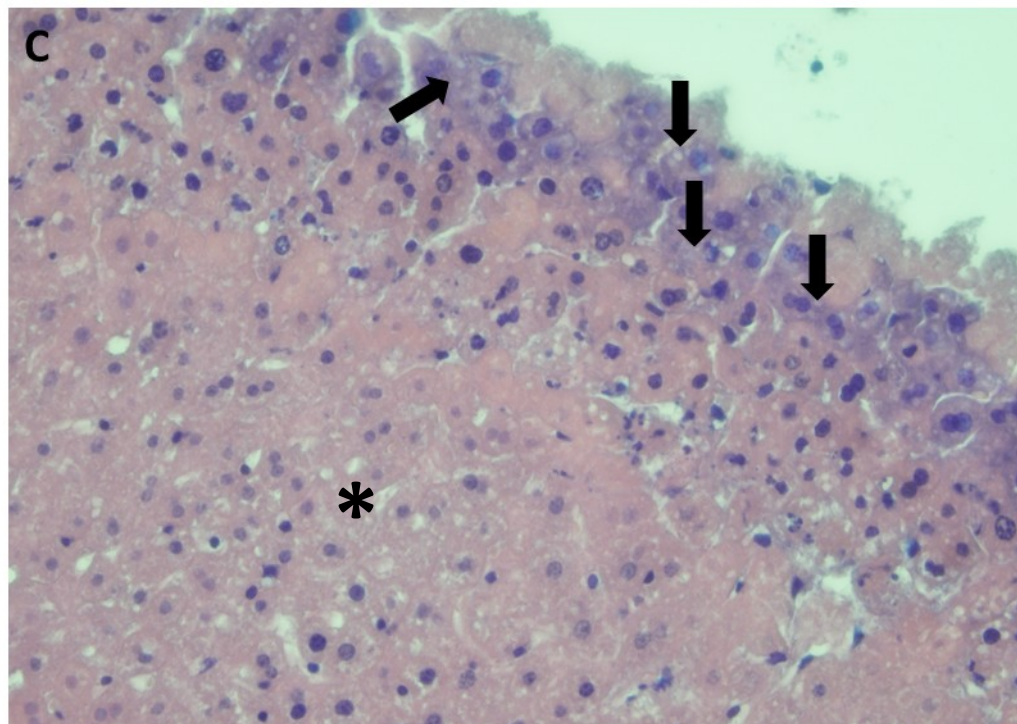
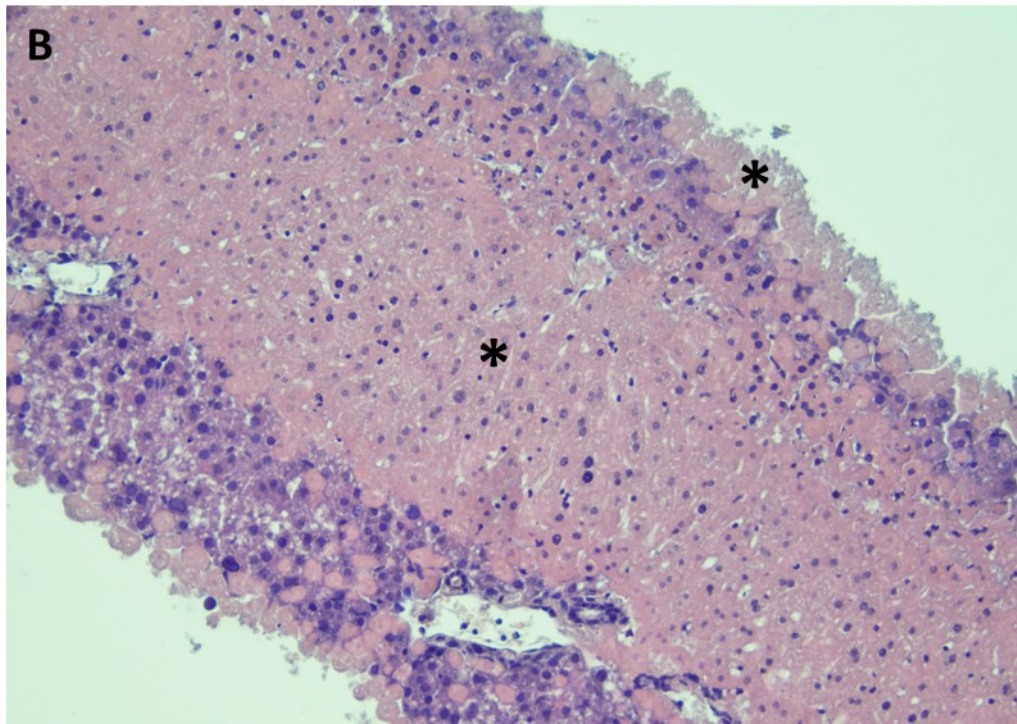
Barvení HE precizních jaterních řezů bez inkubace zobrazuje typickou zdravou myší jaterní tkáň. Můžeme pozorovat velké hepatocyty s velkým jádrem, výrazným jadérkem a dobře barvitelnou cytoplazmou (obr. č. 10). Po inkubaci 48 hodin ve standardním médiu pozorujeme rozvíjející se nekrózu nejen na periférii řezů, kde se rozvíjí na základě mechanického poškození tkáně při zhotovení řezů, ale i v centrální oblasti řezů. V hepatocytech je viditelná výrazně eozinofilní cytoplazma a menší jádra se světlou karyoplazmou. V jádrech se patrná karyorexe. V zachovalých hepatocytech na periférii řezů pozorujeme balónovou degeneraci hepatocytů, která je charakteristická přítomností většího množství glykogenu a můžeme vidět i malé lipidové kapénky v cytoplasmě (obr. č. 11).

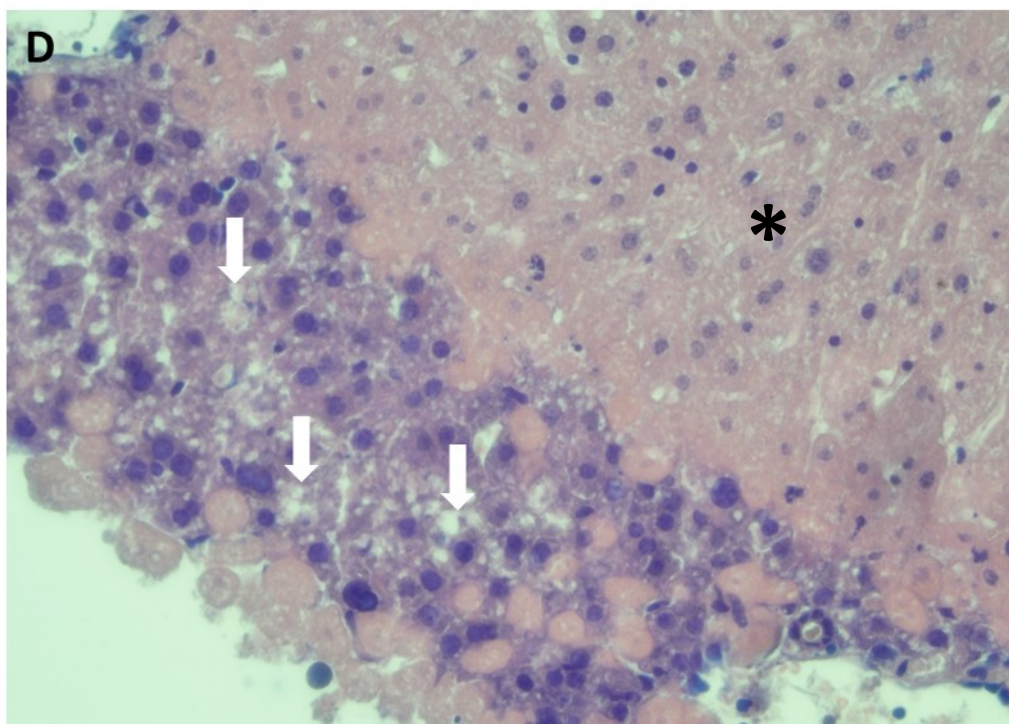




Obrázek č. 10 - Reprezentativní fotografie PCLS bez inkubace, HE, zvětšení 100x (A), zvětšení 200x (B).

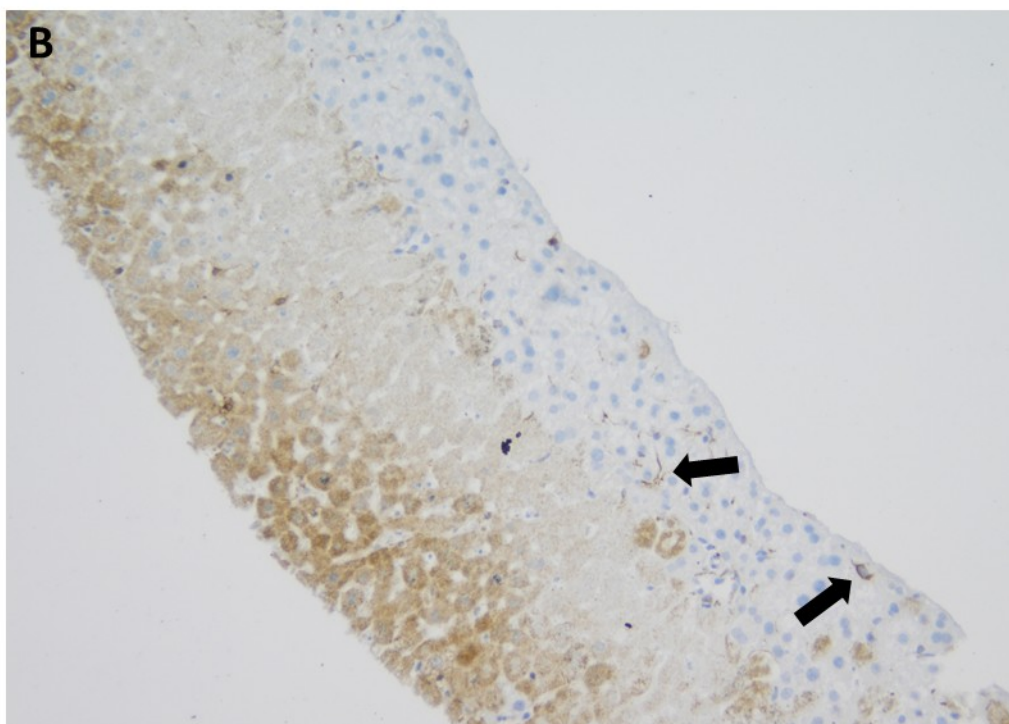
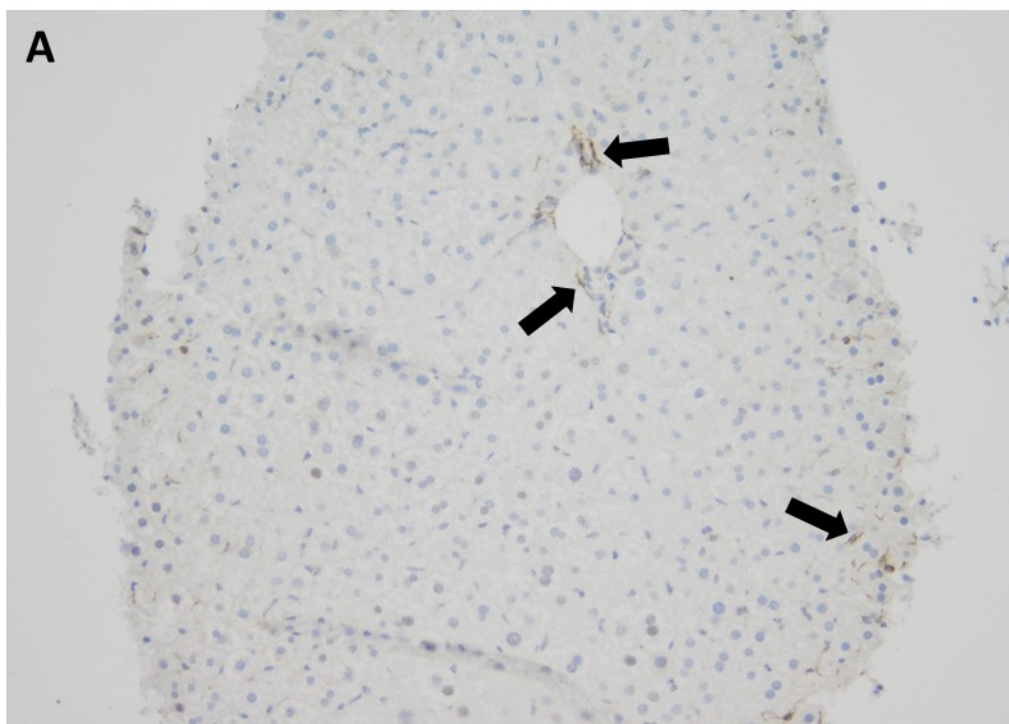




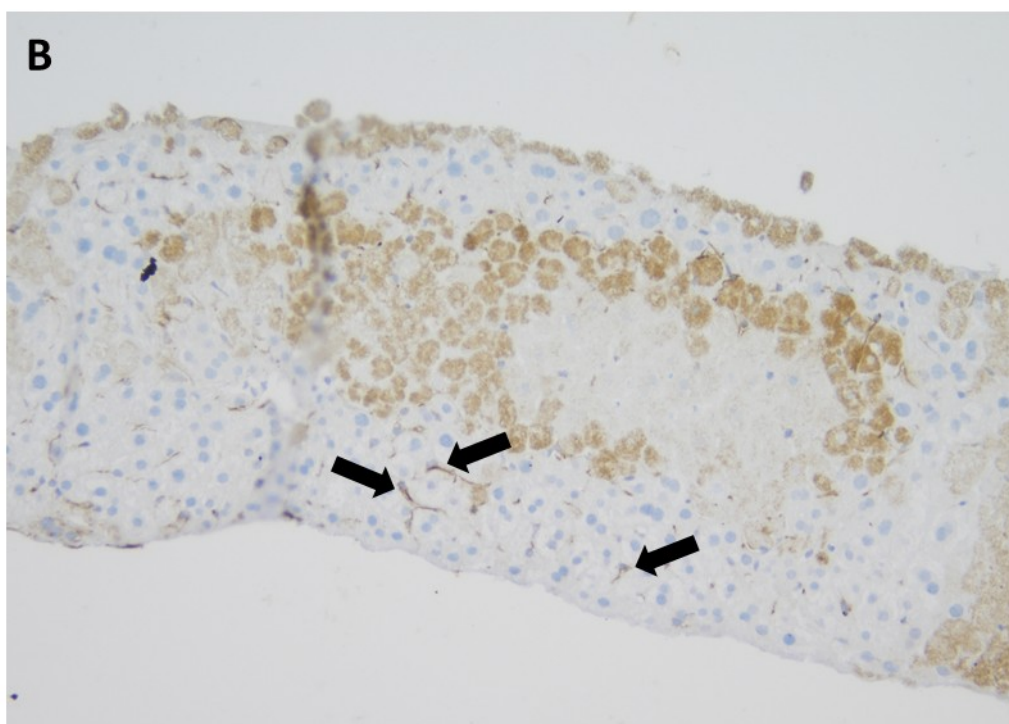
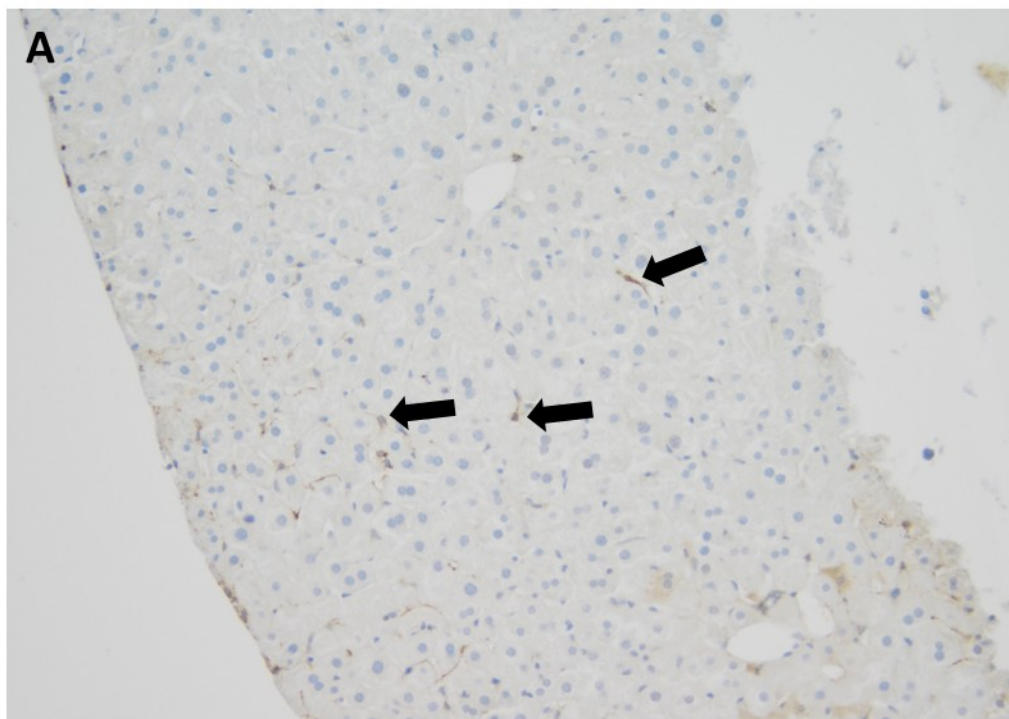


Obrázek č. 11 - Reprezentativní fotografie PCLS po inkubaci 48 hodin v základním médiu, HE, nekróza v centrální oblasti a na periférii řezů (A-D, *), lipidové kapénky (C, černá šipka), balónová degenerace hepatocytů (D, bílá šipka), zvětšení 100x (A), zvětšení 200x (B), zvětšení 400x (C, D).

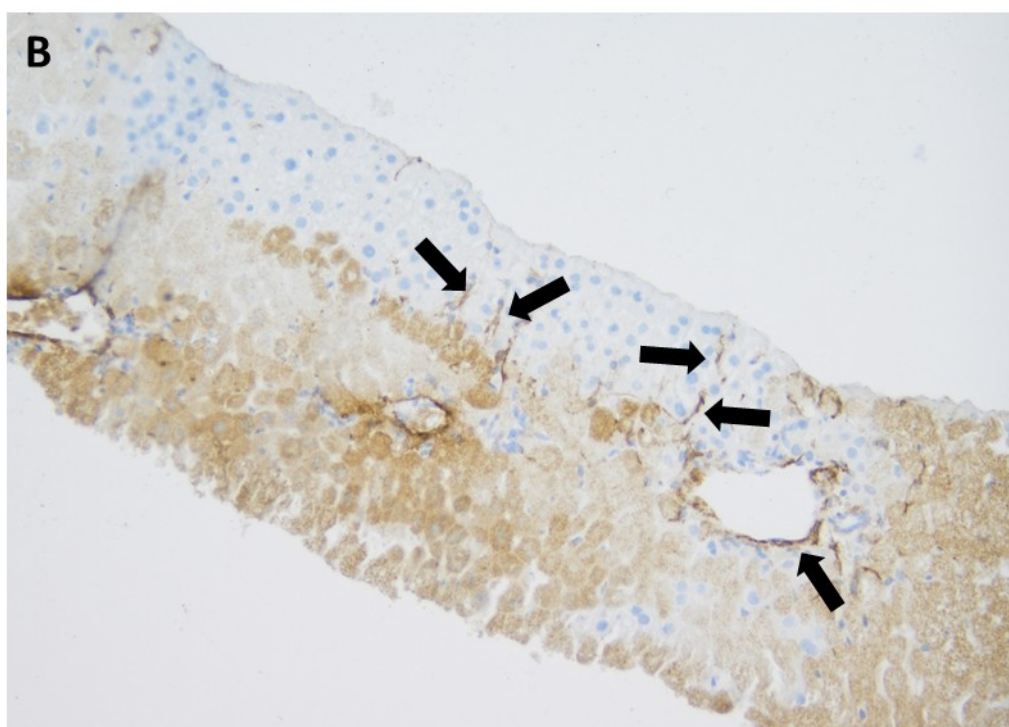
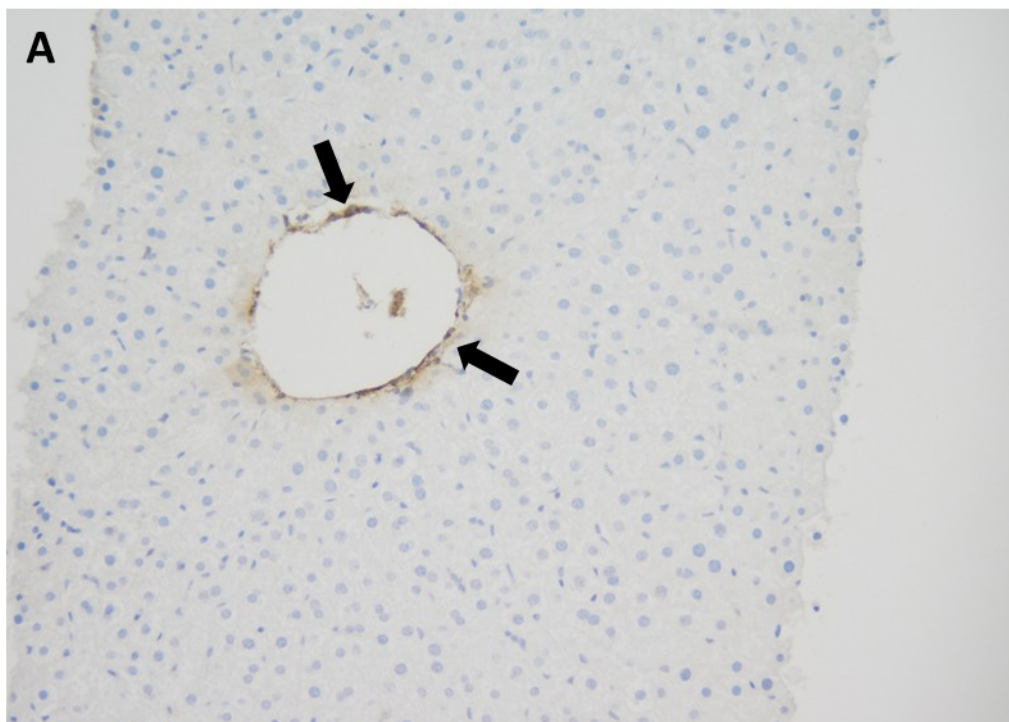
Interpretace výsledků imunohistochemického barvení je výrazně omezená přítomností nekrotického procesu po inkubaci PCLS 48 hodin. Expres GFAP (obr. č. 13A) a desminu (obr. č. 12A), která je charakteristická pro jaterní hvězdicové buňky, je znázorněná na obrázcích hnědou barvou a označuje buňky v Disseho prostoru s kulatým jádrem a výraznými výběžky v řezech bez inkubace. Při porovnání s inkubací 48 hodin můžeme vidět nespecifické zbarvení pozadí z důvodu nekrózy. V zchovalé tkáni nepozorujeme výraznější změny v expresi desminu (obr. č. 12B) ani GFAP (obr. č. 13B). Expres α SMA je charakteristická pro hladké svalové buňky ve stěně cév a portální myofibroblasty v PCLS bez inkubace (obr. č. 14A). Po inkubaci řezů vidíme ve zbytku zchovalé tkáně zvýšení exprese α SMA v buňkách mimo cévy, které může znamenat aktivaci HSC (obr. č. 14B).



Obrázek č. 12 - Reprezentativní fotografie exprese desminu (šipka) v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B), zvětšení 200x.



Obrázek č. 13 - Reprezentativní fotografie exprese GFAP (šipka) v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B), zvětšení 200x.



Obrázek č. 14 - Reprezentativní fotografie exprese α SMA (šipka) v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B), zvětšení 200x.

6. Diskuse

Jaterní fibróza je důsledkem trvalé reakce hojení ran na chronické poškození jater. Mezi hlavní příčiny patří chronická infekce HCV a HBV, alkoholové onemocnění jater, nealkoholická steatohepatitida a autoimunitní onemocnění, jako je primární biliární cirhóza či autoimunitní hepatitida. Morfologicky je jaterní fibróza charakterizována akumulací extracelulární matrix, následovanou tvorbou fibrózní jizvy a cirhózou, která je definována přítomností uzlů regenerujících se hepatocytů se sníženým prokrvením jater. Jaterní hvězdicové buňky jsou hlavní buňky produkující velké množství matrix v poraněných játrech a jsou zároveň hlavním subjektem pro detekci a hodnocení (23).

Modely pro sledování jaterního onemocnění *in vitro* jsou příležitostí k lepšímu pochopení jaterní homeostázy, reakce na poranění či rozvoje rakoviny související například s fibrózou jater. Jednou z metod, které sem patří, jsou ultratenké jaterní řezy (PCLS), ve kterých je celková buněčná různorodost původního orgánu studována *ex vivo*.

I přesto, že precizně řezané plátky jater mohou poskytnout slibný nástroj pro studium fibrózy lidských jater *ex vivo*, používají se pouze v omezeném počtu pro studium fibrózy a pro testování účinků pro- a anti-fibrotických látek vzhledem k související aktivaci HSC.

Vlastní krájení tkáně indukuje poškození jater a buněčnou smrt, což nakonec spustí reparační a regenerační odpověď vedoucí k fibróze, jakmile jsou plátky umístěny do kultury. Kvůli krájení jaterní tkáně během produkce PCLS dochází k aktivaci HSC během prvních 48 hodin kultivace (20). Tato reakce sice představuje poškození tkáně, nicméně na druhou stranu nám dává možnost sledovat reakci jaterních hvězdicových buněk na toto poškození bez nutnosti využití velkého počtu zvířat pro indukci jaterní fibrózy *in vivo*. V naší práci jsme však zjistili, že došlo k rozvoji buněčné smrti hepatocytů i v centrální oblasti řezů.

Hodnocení výsledků imunohistochemického barvení bylo tedy výrazně omezené v důsledku přítomnosti nekrózy, která v řezech vznikla mechanickým poškozením po jejich nakrájení a následné inkubaci PCLS po 48 hodinách. V řezech bylo pozorováno

nespecifické zbarvení pozadí kvůli přítomnosti nekrózy. Způsob inkubace jaterních řezů a tloušťka řezů také vysoce ovlivňují výsledky studií inkubačních podmínek či studií metabolismu v PCLS. Kdyby se nám povedlo udržet jaterní řezy viabilní bez vzniku interferující nekrózy, dala by se detekce fibrotických prekurzorů věrohodně reprodukovat.

Pro imunohistochemické stanovování a buněčné sledování aktivovaných HSC bylo během několika posledních let objeveno široké spektrum specifických markerů. Proto můžeme dnes tyto buňky velice dobře charakterizovat. Patří sem markery s ektodermovým původem (např. GFAP, nestin, nervový růstový faktor (NGF)) a markery mezodermového původu (desmin, alfa-aktin hladkého svalstva (α SMA) a hematopoetické markery) a lecitin-retinol acyltransferáza (LRAT). Kromě toho HSC exprimují vimentin, prokolageny I, III, kolagen IV, V, laminin a fibronektin a mají také své neurální markery (24). Imunohistochemické metody kromě toho mohou také poskytnout informace o konkrétní lokalizaci buněk exprimujících tyto proteiny v jaterním řezu (25).

Ve vlastní experimentální části jsme stanovovali markery desminu, alfa-aktinu hladkého svalstva a GFAP. Exprese desminu hvězdicovými buňkami představuje „zlatý standard“ pro detekci HSC v játrech hlodavců, ale ukázalo se, že jeho využitelnost může být snížena kvůli jeho menší expresi v lidských Itoových buňkách. Pozitivita desminu tak může být často u HSC kontroverzní. Izoforma aktinu α SMA je pak jediným z nejkonzistentnějších markerů aktivovaných a myofibroblastických HSC, protože není přítomen v jiných jaterních buňkách, kromě portálních myofibroblastů a buněk hladkého svalstva cév. Silná pozitivita HSC na α SMA je vykazována u chronického onemocnění jater a s tím související jaterní fibrózou. GFAP je intermediální vlákno, exprimované astrocyty, poskytující podporu a sílu těmto buňkám. GFAP není jen časným markerem aktivace HSC, ale byla i popsána pozitivita GFAP v normálních lidských játrech (24).

Výsledky bakalářské práce poukazují na zvýšenou expresi markeru α SMA v zachovalé tkáni po 48 hodinové inkubaci nejen ve stěně cév, ale i v buňkách v zachovalé tkáni. Toto zvýšení může indikovat aktivaci HSC, i když jsme nepozorovali výraznější změny v expresi desminu a GFAP.

Do budoucna je určitě perspektivní věnovat se studiu obecného využití PCLS, které mohou rovněž sloužit i pro studie toxicity a metabolismu léčiv, přičemž v této oblasti se jejich využití stává stále populárnějším. Na základě našich výsledků je patrné, že navzdory širokému spektru kvantitativních vyšetřovacích metod má histologické hodnocení své nezastupitelné místo při studiu patologických procesů u různých onemocnění.

7. Závěr

V rámci bakalářské práce bylo zjištěno zvýšení exprese u jednoho (α SMA) ze tří vybraných profibrotických prekurzorů po provedení imunohistochemické detekce.

Z myších jater byly vytvořeny ultratenké precizní řezy o tloušťce 150 μ m. Kontrolní řezy byly ihned po zhotovení přeneseny do 4% paraformaldehydu a fixovány 24-48 hodin. Řezy pro studium fibrózy byly inkubovány 48 hodin v základním Williamsově médiu obohaceném glukózou a s přídavkem gentamycinu. V inkubovaných a kontrolních řezech byla sledována exprese desminových, GFAP a α SMA markerů. Interpretace výsledků imunohistochemického barvení byla výrazně omezená přítomností nekrotického procesu po inkubaci PCLS 48 hodin. U řezů s inkubací 48 hodin bylo pozorováno nespecifické zbarvení pozadí z důvodu nekrózy. V zachovalé tkáni po 48 hodinové inkubaci nebyly pozorovány výraznější změny v expresi desminu ani GFAP. Po inkubaci řezů bylo pozorováno ve zbytku zachovalé tkáně zvýšení exprese α SMA, které může znamenat aktivaci HSC.

8. Použité zkratky

ABC	avidin-biotin komplex
ATP	adenosintrifosfát
ALD	alkoholické onemocnění jater
ASH	alkoholická steatohepatitida
DAB	diaminobenzidin
ECM	extracelulární matrix
GFAP	gliový fibrilární kyselý protein
HBV	virová hepatitida B
HCV	virová hepatitida C
HE	barvení hematoxylin-eosin
HDL	high density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)
HSC	hepatic stellate cells (jaterní hvězdicové buňky)
IHC	imunohistochemické barvení
IL-1β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
LDL	low density lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)
LRAT	lecitin retinol acyltransferáza
NAFLD	nealkoholické ztučnění jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NGF	nervový růstový faktor
p75	nízkoafinitní receptor pro nervový růstový faktor
PAS-D	PAS barvení v kombinaci s diastázou štěpící glykogen
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCLS	precision-cut liver slices (ultratenké jaterní řezy)
PDGF	destičkový růstový faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
TGF-β	transformující růstový faktor β
TNF	tumor nekrotizující faktor
VLDL	very low density lipoprotein (lipoprotein s velmi nízkou hustotou)
α-SMA	alfa aktin hladkého svalstva

9. Seznam obrázků

1. Obr. č. 1 – Přední povrch jater
2. Obr. č. 2 – Zadní povrch jater
3. Obr. č. 3 – Vazivové úpony jater
4. Obr. č. 4 – Pohled na játra ze spodu
5. Obr. č. 5 – Jaterní buňky (hepatocyty) pod mikroskopem
6. Obr. č. 6 – Schéma hepatocytu
7. Obr. č. 7 – Kuppferovy buňky pod PAS-D barvením
8. Obr. č. 8 – Itovy buňky pod světelným mikroskopem
9. Obr. č. 9 Tři stádia cirhózy hepatitidy C vykazující různé stupně ukládání fibrózy
10. Obr. č. 10 - Reprezentativní fotografie PCLS bez inkubace, HE
11. Obr. č. 11 - Reprezentativní fotografie PCLS po inkubaci 48 hodin v základním médiu, HE
12. Obr. č. 12 - Reprezentativní fotografie exprese desminu v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B)
13. Obr. č. 13 - Reprezentativní fotografie exprese GFAP v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B)
14. Obr. č. 14 - Reprezentativní fotografie exprese α SMA v PCLS bez inkubace (A) a po inkubaci 48 hodin v základním médiu (B)

10. Použitá literatura

1. ROEHLEN, Natascha, Emilie CROUCHET a Thomas F. BAUMERT. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* [online]. 2020, **9**(4) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9040875
2. ABDEL-MISIH, Sherif R.Z. a Mark BLOOMSTON. Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America* [online]. 2010, **90**(4), 643-653 [cit. 2023-03-06]. ISSN 00396109. Dostupné z: doi:10.1016/j.suc.2010.04.017
3. DOOLEY, James a Sheila SHERLOCK. *Diseases of the Liver & Biliary System: Chapter 1* [online]. 11th Edition. Wiley-Blackwell, 2002 [cit. 2023-03-06]. ISBN 0632055820.
4. MALARKEY, David E., Kennita JOHNSON, Linda RYAN, Gary BOORMAN a Robert R. MARONPOT. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology* [online]. 2005, **33**(1), 27-34 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230590881826
5. *Hepatocytes under the microscope* [online]. In: . [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://media.istockphoto.com/id/861209210/photo/nucleolus-hepatocyte.jpg?s=612x612&w=0&k=20&c=Xr1IXHJp6ol099chjgSGJeoBlzlhOWsJ3JfoEJlbEj4=>
6. *Schéma hepatocytu* [online]. In: . [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/7027654/22/images/3/Sch%C3%A9ma+hepatocytu+300+miliard+ban%C4%9Bk+v+j%C3%A1trech+%2880%25+hepatocytu%29.jpg>
7. *Kupffer cells stained in PAS-D* [online]. In: . [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/orfpath/images/kupffer.jpg>
8. Dixon Laura J., Barnes Mark, Tang Hui, Pritchard Michele T., Nagy Laura E. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol.* 2013 Apr;3(2):785-97 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: doi: 10.1002/cphy.c120026. PMID: 23720329; PMCID: PMC4748178.
9. KHOMICH, Olga, Alexander V. IVANOV a Birke BARTOSCH. Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Cells* [online]. 2020, **9**(1) [cit. 2023-03-20]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9010024
10. MAK, Ki M., Chien Yi M. PNG a Danielle J. LEE. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *The Anatomical Record* 2016, **299**(5), 613-629 ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.23330, *Immunoperoxidase staining of hepatic stellate cells* [online]. In: . [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/profile/C-Y-Maximilian-Png/publication/295871245/figure/fig6/AS:668874081058818@1536483416201/Immunoperoxidase-staining-of-hepatic-stellate-cells-HSCs-for-COLV-in-normal-human.png>
11. HIGASHI, Takaaki, Scott L. FRIEDMAN a Yujin HOSHIDA. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2017, **121**, 27-42 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2017.05.007
12. BATALLER, Ramón a David A. BRENNER. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2005, **115**(2), 209-218 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI200524282

13. FRIEDMAN, Scott L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews* [online]. 2008, **88**(1), 125-172 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00013.2007
14. ZHANG, Chong-Yang, Wei-Gang YUAN, Pei HE, Jia-Hui LEI a Chun-Xu WANG. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(48) [cit. 2023-03-20]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i48.10512
15. CRESPO YANGUAS, Sara, Bruno COGLIATI, Joost WILLEBRORDS, et al. Experimental models of liver fibrosis. *Archives of Toxicology* [online]. 2016, **90**(5), 1025-1048 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-015-1543-4
16. WESTRA, Inge M., Bao Tung PHAM, Geny M. M. GROOTHUIS a Peter OLINGA. Evaluation of fibrosis in precision-cut tissue slices. *Xenobiotica* [online]. 2012, **43**(1), 98-112 [cit. 2023-03-21]. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.3109/00498254.2012.723151
17. KARANJIA, Rustam N, Mary M E CROSSEY, I Jane COX, Haddy K S FYE, Ramou NJIE, Robert D GOLDIN a Simon D TAYLOR-ROBINSON. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(45) [cit. 2023-03-21]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i45.9880
18. ZHOU, Wen-Ce. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(23) [cit. 2023-03-21]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v20.i23.7312
19. VENKATESH, Sudhakar K. a Michael S. TORBENSON. Liver fibrosis quantification. *Abdominal Radiology* 2022, **47**(3), 1032-1052 ISSN 2366-004X. Dostupné z: doi:10.1007/s00261-021-03396-y *Fibrosis deposition in hepatitis cirrhosis* [online]. In: [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: https://media.springernature.com/full/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs00261-021-03396-y/MediaObjects/261_2021_3396_Fig2_HTML.jpg?as=webp
20. PALMA, Elena, Ewald Jan DOORNEBAL a Shilpa CHOKSHI. Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology International* [online]. 2019, **13**(1), 51-57 [cit. 2023-03-21]. ISSN 1936-0533. Dostupné z: doi:10.1007/s12072-018-9913-7
21. DEWYSE, Liza, Hendrik REYNAERT a Leo A. VAN GRUNSVEN. Best Practices and Progress in Precision-Cut Liver Slice Cultures. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(13) [cit. 2023-03-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22137137
22. ZHU, Yu, Bowen CAO, Arianna TOLONE, Jie YAN, Gustav CHRISTENSEN, Blanca ARANGO-GONZALEZ, Marius UEFFING a François PAQUET-DURAND. In vitro Model Systems for Studies Into Retinal Neuroprotection. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2022, **16** [cit. 2023-03-21]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2022.938089
23. DHAR, Debanjan, Jacopo BAGLIERI, Tatiana KISSELEVA a David A BRENNER. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2020, **245**(2), 96-108 [cit. 2023-04-07]. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/1535370219898141
24. SUFLEȚEL, Rada-Teodora, Carmen Stanca MELINCOVICI, Bogdan-Alexandru GHEBAN, Zaharie TOADER a Carmen Mihaela MIHU. Hepatic stellate cells – from past till present: morphology, human markers, human cell lines, behavior in normal and liver pathology. *Romanian Journal of*

Morphology and Embryology [online]. 2021, **61**(3), 615-642 [cit. 2023-04-07]. ISSN 12200522.
Dostupné z: doi:10.47162/RJME.61.3.01

25. VAN DE BOVENKAMP, Marja, Geny M.M. GROOTHUIS, Dirk K.F. MEIJER a Peter OLINGA. Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicology in Vitro* [online]. 2007, **21**(4), 545-557 [cit. 2023-03-21]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2006.12.009