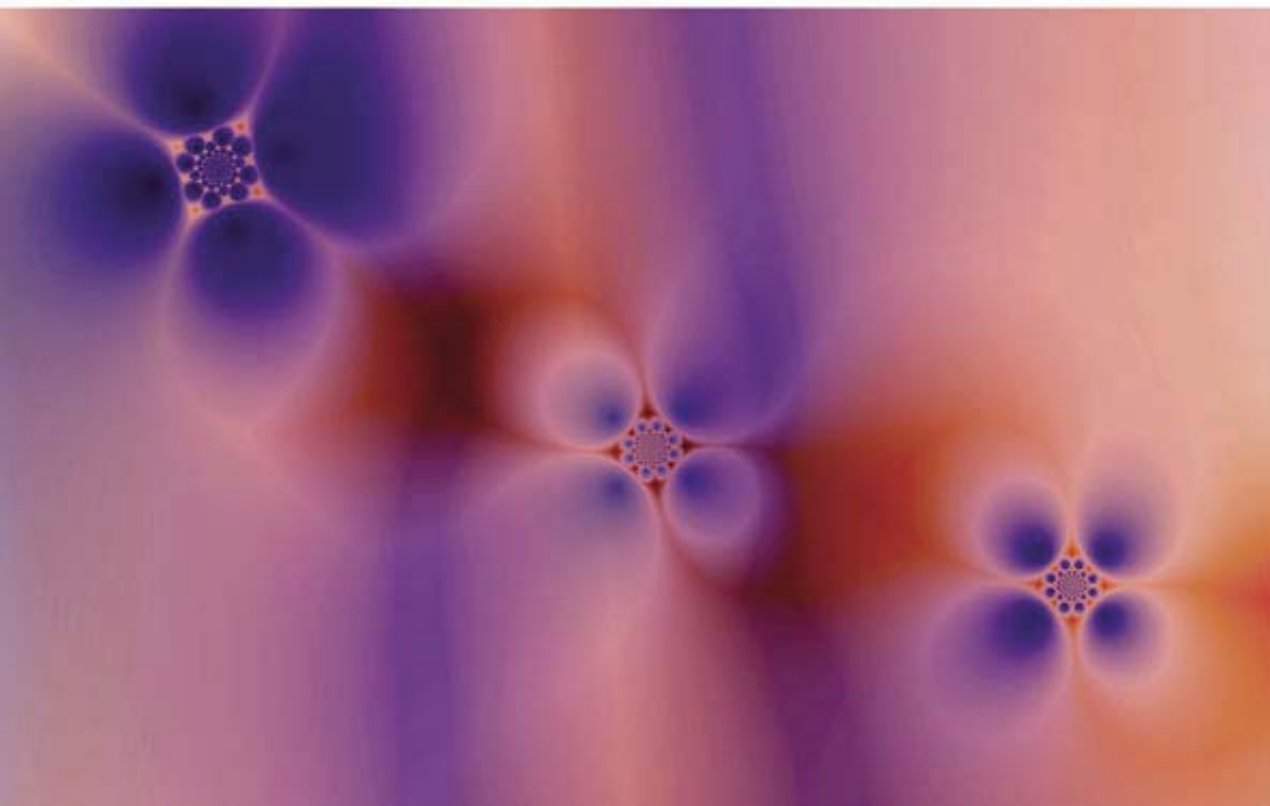


Julius Špičák a kolektiv

---

# Novinky v gastroenterologii a hepatologii

---



## Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

*Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umístování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.*



# NOVINKY V GASTROENTEROLOGII A HEPATOLOGII

## Vedoucí autorského kolektivu:

Doc. MUDr. Julius Špičák, CSc.

## Autorský kolektiv:

Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.

Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.

Doc. MUDr. Jan Leffler, CSc.

Doc. MUDr. Milan Lukáš, CSc.

MUDr. Jan Martínek, Ph.D.

MUDr. Jan Petrášek

Doc. MUDr. Stanislav Rejchrt, Ph.D.

MUDr. Jan Šperl, Ph.D.

Doc. MUDr. Julius Špičák, CSc.

MUDr. Ilja Tachecí

MUDr. Pavel Taimr

MUDr. Pavel Trunečka, CSc.

Doc. MUDr. Petr Urbánek, CSc.

## Recenze:

Doc. MUDr. Pavel Kohout, Ph.D.

Doc. MUDr. Vlastimil Procházka, Ph.D.

© Grada Publishing, a.s., 2008

Obrázky z archivů autorů.

Cover Photo © profimedia.cz, 2008

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 3118. publikaci

Odpovědná redaktorka PhDr. Viola Lyčková

Sazba a zlom Josef Lutka

Počet stran 424 + 20 stran barevné přílohy

1. vydání, Praha 2008

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a. s.

Husova ulice 1881, Havlíčkův Brod

*Autoři i nakladatelství děkují společností*

*SOLVAY Pharma, s.r.o., a ROCHE s.r.o. Pharmaceuticals*

*za podporu, která umožnila vydání publikace.*



**SOLVAY  
PHARMA s.r.o.**



Tato publikace je určena pro odbornou zdravotnickou veřejnost a pracovníky ve zdravotnictví vybraných oborů.

*Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.*

*Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.*

*Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.*

**ISBN 978-80-247-1783-8**

(tištěná verze)

**ISBN 978-80-247-6769-7**

(elektronická verze ve formátu PDF)

© Grada Publishing, a.s. 2011

# Obsah

|  |            |
|--|------------|
| <b>1 Fibróza jater (patogeneze, diagnóza, terapie) .....</b>                       | <b>5</b>   |
| <b>2 Genetické faktory v patogenezi alkoholické nemoci jater .....</b>             | <b>85</b>  |
| <b>3 Helicobacter pylori a nesteroidní antiflogistika .....</b>                    | <b>119</b> |
| <b>4 Biologická terapie a idiopatické střevní záněty – současný<br/>stav .....</b> | <b>151</b> |
| <b>5 Antibiotická profylaxe u akutní pankreatitidy .....</b>                       | <b>171</b> |
| <b>6 Endoskopická resekce .....</b>  | <b>189</b> |
| <b>7 Kapslová endoskopie .....</b>   | <b>229</b> |
| <b>8 Léčba chronické hepatitidy B .....</b>  | <b>271</b> |
| <b>9 Infekce virem hepatitidy C .....</b>  | <b>295</b> |
| <b>10 Výběr nemocných na čekací listinu na transplantaci jater .....</b>           | <b>325</b> |
| <b>11 Cystické léze pankreatu .....</b>  | <b>357</b> |
| <b>12 Současné možnosti laparoskopické chirurgie .....</b>                         | <b>385</b> |
| <b>Rejstřík .....</b>  | <b>411</b> |

# 1 Fibróza jater (patogeneze, diagnóza, terapie)

*Pavel Taimr*

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.1    | Fibróza a cirhóza .....   | 7  |
| 1.2    | Patofyziologické mechanismy fibrózy jater .....                                   | 8  |
| 1.2.1  | Extracelulární matrix .....   | 9  |
| 1.2.2  | Buněčné zdroje extracelulární matrix v normálních<br>a fibrotických játrech ..... | 11 |
| 1.2.3  | Aktivace jaterních hvězdicových buněk a extracelulární<br>signalizace .....       | 14 |
| 1.2.4  | Intracelulární signalizace .....  | 19 |
| 1.3    | Genetické faktory fibrózy .....   | 20 |
| 1.4    | Patogeneze fibrózy u různých jaterních chorob .....                               | 22 |
| 1.5    | Vaskulární změny u cirhózy .....  | 24 |
| 1.6    | Regenerace jater .....  | 25 |
| 1.7    | Reverzibilita fibrózy jater .....   | 27 |
| 1.7.1  | Apoptóza jaterních myofibroblastů .....   | 28 |
| 1.7.2  | Imunotolerance a fibróza jater .....  | 29 |
| 1.7.3  | Progrese fibrózy jater .....  | 30 |
| 1.8    | Necirhotická portální fibróza .....   | 31 |
| 1.9    | Klinická diagnóza a hodnocení pokročilosti fibrózy .....                          | 31 |
| 1.9.1  | Biopsie jater .....   | 31 |
| 1.9.2  | Imunohistochemické studie .....   | 33 |
| 1.9.3  | Zobrazovací metody .....  | 33 |
| 1.9.4  | Funkční jaterní testy .....   | 37 |
| 1.9.5  | Sérologická vyšetření .....   | 38 |
| 1.10   | Terapie fibrózy jater .....   | 46 |
| 1.10.1 | Léčba základního onemocnění .....   | 46 |
| 1.10.2 | Snížení zánětu a imunitní odpovědi .....  | 47 |
| 1.10.3 | Inhibice aktivace hvězdicových buněk .....  | 47 |
| 1.10.4 | Potlačení projevů aktivovaných hvězdicových buněk .....                           | 49 |
| 1.10.5 | Stimulace apoptózy .....  | 50 |
| 1.10.6 | Stimulace degradace extracelulární matrix .....                                   | 51 |
| 1.10.7 | Ovlivnění angiogeneze a regenerace jater .....                                    | 52 |
| 1.10.8 | Metody zacílení léčby na jaterní buňky .....                                      | 52 |
| 1.11   | Shrnutí .....   | 55 |
| 1.12   | Výhledy .....   | 57 |
|        | <b>Literatura</b> .....   | 57 |

# 1 Fibróza jater (patogeneze, diagnóza, terapie)

Problematika jaterní fibrózy se v posledních 20 letech podstatně změnila. Z laboratorního tématu, kterému se věnovalo několik teoreticky orientovaných hepatologů nebo biochemiků, se stal předmět čím dál více zasahující do práce klinických lékařů, téma denní praxe. Jaterní fibróza je ústředním tématem té části hepatologie, která se věnuje chronickým chorobám, což je dáno tím, že zjištění jater je společným následkem prakticky všech chronických jaterních chorob. Vývoj znalostí odráží narůstající množství dat a informací, které jsme získali rozvojem molekulárních metod v oboru, zlepšeným zachytem řady onemocnění jater i z jejich zvýšeného přežívání. Fibróza jater je také otázkou potransplantační péče.

Obor hepatologie se tedy výrazně změnil. Prokázané nové diagnostické a léčebné metody zvýšily zájem o obor, což vedlo ke vstupu finančně silnějších investorů a nárůstu množství poskytovaných grantů (1). Změny podnítily zejména:

1. rozvoj molekulární biologie,
2. nové endoskopické techniky, zvláště v léčbě následků portální hypertenze,
3. program transplantace jater a
4. nové protivirové léky.

V laboratorní oblasti byla metodologickým klíčovým faktorem schopnost diferencované izolace a kultivace jednotlivých sinusoidálních buněk. Velmi důležité začínají být také nové laboratorní techniky postgenomové éry. Vědecko-klinické úsilí zatím kulminovalo v poznání, že fibróza/cirhóza může být reverzibilní, a v realistickém předpokladu, že účinná antifibrotická léčba významným způsobem změní léčbu a prognózu pacientů s jaterními chorobami. Klasické klinické přístupy a schémata se nyní kriticky přehodnocují, situace je náchylná ke spekulacím a vyžaduje vytvoření nových jasných koncepcí a konsenzů (2).

Při hodnocení narůstajícího množství článků a nových informací týkajících se fibrózy jater je nutné mít na paměti, že:

1. „nový objev“ může být skutečně novým objevem, ale také prostě nově přebaleným a upraveným objevem starým;
2. může se jednat o „nadhodnocení“ dat;
3. vzrušující příběh nemusí nezbytně být vždy pravdivý.

## 1.1 Fibróza a cirhóza

**Fibróza** je termín popisující strukturální změny jaterní tkáně v souvislosti s nadměrným uložením vazivových hmot. Došlo k změně regulace syntézy a degradace ve prospěch tvorby. **Cirhózu jater** lze definovat jako konečné stadium difuzní fibrotizace jaterního parenchymu s tvorbou uzlovitých regenerativních struktur a s narušením jaterní funkce. V této definici je již záměrně vynechán údaj o ireverzibilitě cirhózy (3). Cirhotická játra jsou kombinací změn

1. fibrotických,
2. vaskulárních a
3. nodulárně regeneračních.

Termín „cirhóza“ poprvé použil Laennec v *Traité de l'Auscultation* (1819).

**Fibrogeneze** je termín popisující tvorbu extracelulární matrix (ECM), zvyšuje se v reakci na poškození a je nezbytná pro hojivé procesy jater.

**Fibrolýza** je odstranění nadměrné extracelulární matrix poté, co byly hojivé procesy jater skončeny a přítomnost nadměrného množství ECM není více potřebná.

Fibróza a cirhóza byly historicky považovány za pasivní a ireverzibilní procesy v důsledku kolapsu jaterního parenchymu a jeho nahrazením tkání bohatou kolagenem (4). Dnes se ale fibróza považuje za model aktivního jizevnatého hojení rány, tj. do určité míry uniformní odpovědi jaterní tkáně na chronické jaterní poškození. Krátkodobé, časově omezené narušení jaterního parenchymu nevede k tvorbě fibrózy. Na rozdíl od ostatních orgánů je pokročilá fibrotizace jater ve stadiu cirhózy spojena s tvorbou vazivových sept, včetně porto-centrálních, které v sobě obsahují cévní zkraty (porto-systémové shunty). Vaskulární komponenta je pro vznik cirhózy nezbytná. Spolu s uzlovitou regenerací parenchymu přispívá k destrukci architektury jater.

Poškození jater má různé příčiny – virové, autoimunitní, metabolické, cholestatické, toxické a polékové. Klinické projevy jsou variabilní a jsou ovlivněny typem, projevem a pokročilostí základního onemocnění. Začátek fibrózy je obvykle pokradmý, nenápadný a většina komplikací či úmrtí je spojena až s rozvojem cirhózy (5). Až 40 % nemocných s cirhózou je asymptomatických, mohou být bez příznaků až jednu dekádu. Přetrvává-li základní vyvolávající onemocnění, pak je progresivní zhoršování nevyhnutelné a dochází k projevům dekompenzované cirhózy – ascitu, encefalopatii či krvácení z varixů. U těchto pokročilých pacientů se předpokládá 50% mortalita do 5 let, je-li ascites tenzní a obtížně léčitelný, tak do 1 roku (6, 7, 8). U bezpříznakových jedinců je cirhóza diagnostikována *post mortem* nebo během rutinního klinického vyšetření (9). Většinou, ale rozhodně ne vždy je vyžadována biopsie jater. Cirhóza je také rizikovým faktorem hepatocelulárního karcinomu. U dekompenzované cirhózy je pak obvykle jedinou účinnou léčbou transplantace jater.

Přirozený průběh jaterní fibrózy je ovlivněn genetickými faktory a vlivy prostředí. Epidemiologické studie identifikovaly polymorfizmy v řadě genů (genetický polymorfismus je jev, při kterém jsou v dané populaci přítomny dva nebo více geneticky determinované fenotypy v takových proporcích, že nejméně častý z nich nemůže být udržován pouhou opakovanou mutací (10) s předpokládaným vztahem k fibróze jater (tzv. kandidátské geny). Tyto genetické faktory mohou vysvětlit široké klinické spektrum u různých nemocných se stejným etiologickým faktorem. Bohužel jsou výsledky studií klinických i experimentálních doposud velmi nekonkluzivní a jejich metodologie je až příliš často chabá.

## 1.2 Patofyziologické mechanismy fibrózy jater

Fibróza jater je dynamický proces, který vede k nadměrnému ukládání komponent extracelulární matrix. Jedná se o multifunkční proces, zahrnující aktivitu řady buněčných typů, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (11). Složení patologické matrix, aktivní buňky, cytokiny, chemokiny atd. jsou z velké části obdobné, bez ohledu na vyvolávající chorobu. Fibróza se objevuje nejdříve v oblastech nejvíce poškozených. Vychází z narušené regulace homeostatických mechanismů, které udržují ekosystém jater v rovnováze. Po akutním poškození (např. akutní virová hepatitida) parenchymové buňky zregenerují a nahradí nekrotické nebo apoptotické buňky. Tento proces



je spojen se zánětlivou reakcí a limitovaným uložením extracelulární matrix. Fibrotizační proces zpočátku ochraňuje jaterní buňky před dalším poškozováním. Jestliže ale vyvolávající poškození přetrvává i nadále, pak dochází k selhání regeneračních schopností a hepatocyty jsou nahrazovány nadměrnou ECM. Distribuce tohoto fibrózního materiálu závisí na původu poškození jater. U chronické virové hepatitidy a chronické cholestázy začíná ukládání vaziva v periportálních oblastech, zatímco u alkoholového poškození dominují zpočátku lokality pericentrální a perisinusoidní (12). Jak fibrotizace tkáně pokračuje, vazivové pruhy vytvářejí přemostující septa, naruší vaskulaturu, dochází k tvorbě regeneračních uzlů a k vzniku cirhózy.

Při cirhóze jater dochází k jejich funkčnímu poškození. Existují dvě základní teorie, které vysvětlují toto poškození – teorie zdravého hepatocytu a teorie poškozeného hepatocytu. Teorie zdravého hepatocytu („sick liver and intact hepatocyte“) tvrdí, že příčinou poškození je existence funkčních intrahepatálních zkratů, které snižují průtok játry okolo početně snížených, ale jinak přiměřeně zdravých hepatocytů. Naopak „sick cell hypothesis“ zdůrazňuje, že příčinou je progresivní poškození samotného hepatocytu (13).

Ačkoliv se procesu fibrotizace účastní řada buněčných typů, ústřední roli hrají dva typy buněk – **jaterní hvězdčicové buňky** (HSC, hepatic stellate cells) a **portální myofibroblasty**. Nejvíce jsou prozkoumány HSC. Jsou hlavním zdrojem nadměrného množství patologické ECM, řady mediátorů, proteáz a jejich inhibitorů, které spolupracují v hojivých jizevnatých procesech jater. Aktivace perisinusoidních HSC a/nebo portálních myofibroblastů je centrálním jevem fibrózy jater. Všechny původní podněty konvergují ve zvýšené tvorbě extracelulární matrix v těchto buňkách. Objev, že HSC, nikoli hepatocyty, jsou zdrojem patologické ECM (včetně kolagenu I) byl jedním z mezníků v oboru (14). Hepatocyty k novotvorbě vaziva buď vůbec nepřispívají, anebo pouze zcela minimálně (15). Objevem významu portálních myofibroblastů se narušil předchozí koncept unikátnosti konvergenční role HSC v patogenezi fibrózy, ale zatím stále platí, že HSC jsou hlavními producenty ECM v poškozených játrech.

Poškozování jater trvá měsíce až roky, než se vytvoří významné množství jizevnaté tkáně. Reverzibilita fibrózy se týká převážně méně rozvinutých forem, a tudíž se výzkum soustředil zejména na jevy, které vedou k časné akumulaci jizvy.

Základní procesy vedoucí k fibrotizaci různých orgánů jsou si podobné bez ohledu na původ poškození a akcelerovaná fibrogeneze není v žádném případě specifická pro játra (16), ale podobné procesy nalézáme např. v plicích, střevě, pankreatu, kůži a ledvinách (17).

### 1.2.1 Extracelulární matrix

Normální ECM je nezbytnou součástí fyziologicky fungujících jaterních buněk (18). Význam trojrozměrného prostoru a normální zdravé ECM vyplynul z výzkumu kultur hepatocytů a ostatních jaterních buněk při studiu uměle vytvořených jater. Fyziologická ECM je vysoce strukturovaná plastická síť, která je nositelkou a zásobárnou pozičních informací, řídí místní usedlé buňky a je jimi zároveň zpětně ovlivňována. Fibrotická matrix ztrácí tyto fyziologické schopnosti. Dochází k narušení diferenciaci buněk a jejich organizace jako tkáně. Předpokládáme, že právě obnova normálního mikroprostředí jaterních buněk po úspěšné antifibrotické léčbě vede k obnově jaterních funkcí.



Jaterní extracelulární matrix je komplikovanou strukturou makromolekul, která podléhá remodelaci během růstu a poškození. Vytváří nosné pletivo, které: 1. mechanicky udržuje strukturu tkáně, dále pak poskytuje signály buňkám, které jsou nezbytné k udržení 2. polarity buňky, k 3. migraci, 4. proliferaci a 5. diferenciaci. Většina molekul ECM vytváří signály, které jsou pomocí specifických buněčných receptorů (integriny a non-integrinové receptory, jako např. DDR2) převáděny intracelulárně na cytoskeleton buňky (aktivní intracelulární nosné pletivo), a tím ovlivňují transkripci genů. Některé růstové faktory se vážou na ECM a uvolňují se v případě poškození tkáně, čímž dále zesilují hojivé (fibrotizační) pochody. Matrix také vytváří cesty pro migraci buněk (např. leukocyty).

Normální i patologická ECM se skládá z kolagenní a nekolagenní komponenty (19). Hlavním nesolubilním fibrózním proteinem v tkáních je kolagen. Mezi nekolagenní molekuly zahrnujeme glykoproteiny, glykosaminoglykany, proteoglykany, matricelulární proteiny a růstové faktory vázané na matrix (20). Molekulární struktura patologické matrix se u různých etiologií cirhózy jater nijak zásadně neliší. Známe mnoho variant těchto makromolekul, izoform a kombinací v závislosti na oblasti jater a věku pacienta.

Existuje celkem 19 typů humánního kolagenu, ale 80–90 % kolagenu v těle je tvořeno typy I až III. Ve zdravých játrech jsou kolageny (zejm. typy I, III, V a XI) uloženy hlavně v pouzdře, v okolí velkých cév a portálních polí. Pouze menší množství vláken obsahujících typy I a III je v subendotelových prostorech. Kolageny I a III vytvářejí fibrilární makromolekuly, kolagen IV síť, která je součástí bazální matrix.

U pokročilé fibrózy stoupá množství kolagenu 3–10x. Ve fibrotických játrech je přítomno nejen větší množství extracelulární matrix, ale také její složení se mění (viz tabulka 1.1). Struktura extracelulární matrix ve fibrotických játrech se liší výrazným nadbytkem fibrilárních kolagenních vláken (kolagen I a III).

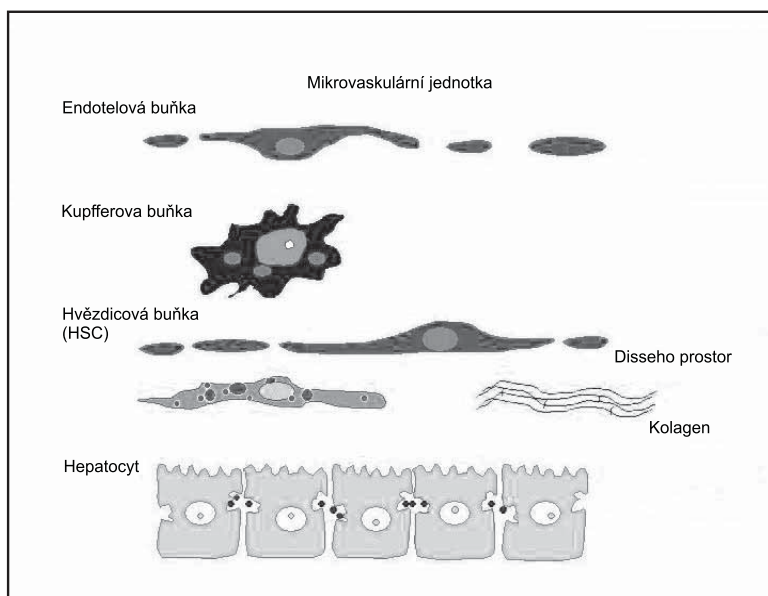
V cirhotických játrech dochází k syntetické i metabolické dysfunkci (21) a narušení transportů řady látek ze sinusoid k hepatocytům (22).

ECM je dynamickým regulátorem buněčné funkce. V počátečních stadiích fibrózy dochází k subendotelové akumulaci matrix (tj. okolo sinusoid v Disseho prostoru). Tato tzv. **kapilarizace sinusoid** může být klíčovým jevem a ve svých důsledcích i významnější než celkové absolutní zmnožení matrix v játrech (23). Disseho prostor obsahuje ve zdravých játrech pouze jemnou matrix bazální membrány o nízké hustotě. Endotelové buňky udržují fenestrace (otvory), kterými intrasinusoidní prostor komunikuje s Disseho prostorem (viz obr. 1.1 a 1.2).

**Tab. 1.1** *Změny ve složení extracelulární matrix (podle: Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: Translating the scientific promise to the clinic. Int J Biochem Cell Biol. 2006 Oct 7; doi:10.1016/j.biocel.2006.10.006)*

| Normální játra  |          | Fibróza           |          |                  |
|-----------------|----------|-------------------|----------|------------------|
| Komponenta ECM  | Množství | Umístění          | Množství | Umístění         |
| Kolagen typ I   | +        | Pouzdro           | +++++++  |                  |
| Kolagen typ III | +        | Portální trakt    | +++      | Disseho prostor  |
| Kolagen typ V   | +        | Okolí velkých cév | +++      |                  |
| Kolagen typ VI  | +        | Perisinusoidálně  | +++      | Perisinusoidálně |

| Normální játra |          | Fibróza         |          |                       |
|----------------|----------|-----------------|----------|-----------------------|
| Komponenta ECM | Množství | Umístění        | Množství | Umístění              |
| Hyaluron       | +        |                 | +++++++  |                       |
| Dermatan       | ++       |                 | +++++    |                       |
| Proteoglykany  | +        | Disseho prostor | ++++     | zejm. Disseho prostor |
| Chondroitin    | +        |                 | +++      |                       |

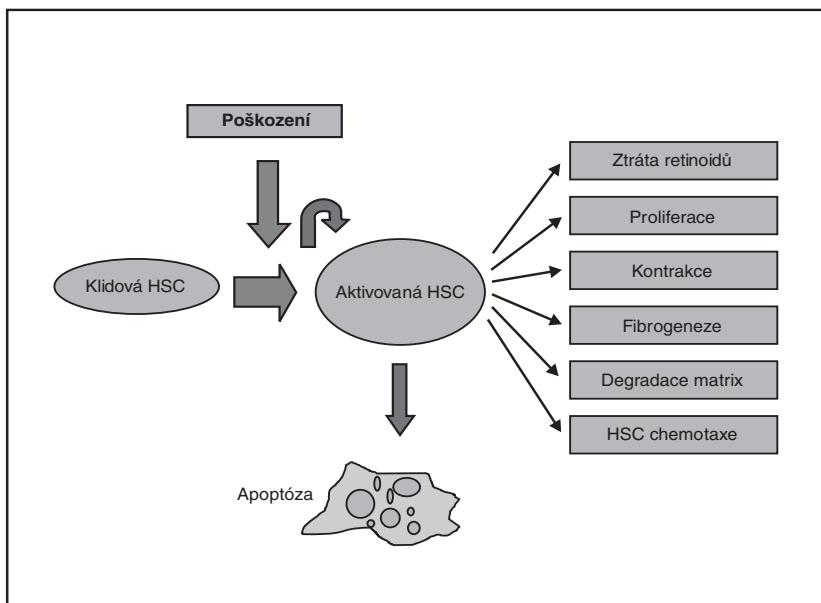


Obr. 1.1 Jaterní sinusoid

Při fibrotizaci se matrix o nízké hustotě nahrazuje intersticiální fibrilární matrix o vysoké hustotě, fenestrace zanikají, komunikace je omezena, a tím dochází k přímému ovlivnění funkce hepatocytů i HSC.

### 1.2.2 Buněčné zdroje extracelulární matrix v normálních a fibrotických játrech

Jaterní tkáň obsahuje část epitelovou (hepatocyty), endotelovou výstelku (s fenestracemi), tkáňové makrofágy (Kupfferovy buňky) a perivaskulární mezenchymové buňky (HSC). Významné jsou další usdlé (NK-buňky) i cirkulující buňky (lymfocyty, leukocyty) a trombocyty. Buňky jater se také rozdělují na parenchymové (hepatocyty) a neparenchymové (ostatní). Buňky jsou organizovány v sinusoidech (mikrovaskulární jednotka), kde subendotelový Disseho prostor odděluje epitelie



**Obr. 1.2** Hvězdicová buňka jaterní (HSC)

(hepatocyty) od endotelových sinusoid. Ve zdravých játrech tento prostor obsahuje místo typické bazální membrány jemnou matrix.

Jaterní hvězdicové buňky (HSC, hepatic stellate cells, dříve lipocyty, Ito-buňky, fat-storing cells, perisinusoidové buňky) jsou primárním a hlavním zdrojem ECM v normálních i fibrotických játrech. Von Kupffer popsal v játrech hvězdicovité buňky („Sternzellen“) již v roce 1876 (24). Počátkem padesátých let 20. století buňky znovu objevil v Japonsku Ito, ale až Wake v roce 1971 demonstroval, že von Kupfferovy „Sternzellen“ a Itovy buňky jsou identické jednotky. Současné Kupfferovy buňky (makrofágy) nejsou identické s původními Kupfferovými „Sternzellen“.

HSC jsou rezidentní perisinusoidové buňky v subendotelových prostorech mezi buňkami endotelu a hepatocyty (viz obr. 1.1) (25). Klidové HSC tvoří asi 5–8 % jaterních buněk a poměr k hepatocytům je cca 1:10. Morfologicky je pro tyto buňky typické, že mají dlouhé výběžky a v cytoplazmě obsahují množství drobných tukových kapének. Kapénky vytvářejí prchavou zelenavou fluorescenci při osvětlení 328 nm. Za patologických podmínek se transdiferencují v myofibroblastům podobné buňky, které se později, při odeznění patologického stimulu stávají náchylnými k vlastní apoptóze (fyziologickému zániku buňky). Metody izolace HSC z krysích i lidských jater byly široce standardizovány v 80. letech 20. století, a umožnily tak rychlý rozvoj výzkumu (26). Kultivace HSC na plastických miskách byla celkově akceptována jako vhodný model ke studiu aktivovaných HSC (27). Dalšími zdroji výzkumu jsou modely na krysích a také byly připraveny kmeny transgenních myší (28).

Embryonální a intrahepatální původ hvězdicovitých buněk není zcela jasný. Předpokládá se mezenchymální původ, ale HSC obsahují také proteinové markery, které jsou charakteristické pro buňky neuroektodermálního původu – glie (reelin, nestin, glial-fibrillary acidic protein – GFAP, a další). Navíc jsou nositeli receptorů pro

neurotransmitéry (29). Jejich dendritická morfologie se podobá spíše než větovitým kožním fibroblastům astrocytům. Dále klidové HSC exprimují markery, které jsou charakteristické pro adipocyty (PPAR-gama, leptin aj.). Subpopulace aktivovaných HSC jsou nositeli cytogenetických markerů naznačujících původ z **kmenových buněk** kostní dřeně. Aktivované HSC vytvářejí také myogenní markery (zejména vlákna hladkého svalu v cytoplazmě – alfa-SMA – smooth muscle actin).

Dále klidové HSC exprimují markery, které jsou charakteristické pro adipocyty (PPAR- $\gamma$ , leptin, aj.). Aktivované HSC vytvářejí také myogenní markery (zejména vlákna hladkého svalu v cytoplazmě -  $\alpha$ -SMA - smooth muscle actin) a sdílejí řadu dalších markerů s pericyty v ostatních orgánech. Předpokládáme, že HSC jsou pericyty jaterních sinusoid.

Subpopulace aktivovaných HSC jsou také nositeli cytogenetických markerů naznačujících původ z kmenových buněk kostní dřeně. Byla potvrzena přítomnost antigenů pluripotentních progenitorových buněk (např. CD133). Během kultivace buněk v rozličných médiích dochází k diferenciaci původně klidových HSC do celkem tří odlišných buněčných typů za současné ztráty CD133 antigenu. Jedna linie odpovídá aktivovaných myofibroblastům, druhá endoteliálním buňkám a třetí byla nositeli markerů hepatocytů, včetně tvorby albuminu a  $\alpha$ -fetoproteinu (393). Je tedy možné, že klidové HSC jsou vlastně pluripotentní buňky, které mají schopnost se diferencovat v parenchymové i neparenchymové buňky jater. Mohou se tak uplatňovat jako možný další zdroj buněk při regeneraci poškozené jaterní tkáň.

Ve zdravých játrech jsou HSC hlavním místem skladování vitamínu A (okolo 40–70 %) (30). Uchovává se ve formě esteru v tukových kapénkách v cytoplazmě HSC. Za fyziologických podmínek hrají HSC klíčovou úlohu v homeostázi retinoidů: exprimují na svém povrchu specifické receptory pro bílkovinu vázající retinol (retinol binding protein – RBP), což je hlavní transportní protein pro retinoly. Mechanismem receptorové endocytózy pohlcují komplex retinol-RBP. U arktických zvířet (polární lišky a medvědi) je množství retinolů v HSC přibližně 20–100x vyšší než u lidí.

**Rozhodující událostí v rozvoji fibrózy jater je proces tzv. aktivace HSC (31). Původně klidné buňky, obsahující kapičky tuků s vitamínem A, se změny na vysoce fibrogenní buňky podobné myofibroblastům.**

Dalšími prokázanými zdroji ECM v játrech jsou **portální a septální myofibroblasty**. Jedná se o buňky lokalizované okolo malých portálních cév a drobných žlučových duktů, které proliferují u chronických cholestatických lézí a iniciují ukládání kolagenu (32, 33). Septální fibroblasty jsou umístěné okolo vytvořených fibrotických sept. Perisinusoidální HSC a portální myofibroblasty se liší ve specifických buněčných znacích a v odpovědi na apoptotické stimuly (34). Odlišnou subpopulací myofibroblastů jsou **tzv. interface-myofibroblasty**, které jsou umístěné v oblasti mezi parenchymem a stromatem portálních polí nebo sept. Diskuze o možném společném původu těchto buněk není uzavřena (35).

Pro uvedené tři druhy buněk (HSC, portální a interface-myofibroblasty) byl navržen společný termín **jaterní myofibroblast** (HM, hepatic myofibroblast).

Předpokládáme i spoluúčast buněk hladkých svalů ve stěně jaterních cév a myofibroblastů lokalizovaných okolo centrolobulární žíly.

Dalšími typy buněk s fibrogenním potenciálem jsou fibroblasty původem z kostní dřeně. Kultury CD34+CD38- hematopoetických kmenových buněk původem z kostní dřeně byly schopny s různými růstovými faktory vytvořit HSC a myofibroblasty, které infiltrovaly poškozený remodelující se jaterní parenchym (36, 37).

Jiné možné zdroje fibrotizace (cirkulující fibrocyty a tzv. epitelově-mezenchymální přeměna, EMT, epithelial-mesenchymal transition) nebyly až donedávna v játrech potvrzeny (38). V roce 2006 byla epitelově-mezenchymální přeměna prokázána i u dospělých jaterních buněk (39). Lokální přeměna epitelových buněk v mezenchymální fibroblasty (mechanismem EMT) byla také potvrzena v jiných orgánech (např. ledvina).

Relativní význam jednotlivých buněčných typů (tj. hlavně HSC, portálních a interface myofibroblastů) ve fibrogenезi může záviset na typu poškození jater. HSC jsou hlavní fibrogenní buňkou u pericelulární a centrolobulární fibrózy, tj. při poškození jater alkoholem, nealkoholickou steatohepatidou, hemochromatózou, Buddovým-Chiariho syndromem a při chronickém městnání. Portální myofibroblasty jsou nejspíše hlavními fibrogenními typy u biliární a septální fibrózy, tj. u primární biliární cirhózy, primární sklerozující cholangitidy a chronické hepatitidy při infekci HBV a HCV.

### **1.2.3 Aktivace jaterních hvězdicových buněk a extracelulární signalizace**

Aktivace hvězdicových buněk je výsledkem souhry faktorů prostředí, vlivu ECM a okolních buněk. Nejčastěji dochází k aktivaci v oblasti hepatocelulárního poškození a následného zánětu.

Aktivaci lze podle průběhu rozdělit na dvě fáze podle Friedmana (40):

1. iniciační fáze (preinflamatorní),
2. udržovací.

První, iniciační fáze zahrnuje časnou parakrinní stimulaci, aktivaci genů a fenotypické změny, které nastaví buňky HSC k vyšší citlivosti na cytokiny a jiné působky. Druhá, fáze udržuje aktivovaný genotyp HSC a vytváří nadměrné množství ECM. Zahrnuje parakrinní i autokrinní stimulaci. Dělení je do určité míry didaktické a řada autorů jej nepoužívá.

#### **Iniciační fáze**

Jedná se o komplexní souhru mnoha buněk a buněčných typů. Časné změny vyplývají z parakrinní stimulace HSC okolními, převážně sinusoidálními buňkami (buňkami endotelu, Kupfferovými buňkami, hepatocyty, destičky a leukocyty) (41). NK-buňky se pravděpodobně uplatňují až ve fázi odstranění fibrózy jater.

*Hepatocyty* jsou narušovány mnoha hepatotoxickými látkami, viry, metabolity alkoholu, žlučovými kyselinami apod. (42). Poškozené hepatocyty – nejpočetnější buněčný typ v játrech – uvolňují kyslíkové radikály a fibrogenní mediátory (TGF-beta1, TNF-alfa, EGF, IGF) a indukují akumulaci leukocytů. Mnohé hepatocyty zahynou procesem apoptózy a stimulují fibrogenní odpovědi aktivovaných myofibroblastů (HSC) (43). V našem experimentu jsme prokázali, že apoptotická tělíška ze zaniklých hepatocytů jsou pohlcována okolními HSC fagocytózou a samotný proces fagocytózy vede k tvorbě profibrogenních cytokinů (TGF-beta) i k exkreci produktů ECM (kolagen I) na úrovni mRNA i proteinu (44).

TGF-β-1 (transforming growth factor beta-1) podporuje přeměnu klidových HSC v aktivované myofibroblasty, výrazně stimuluje produkci proteinů ECM a inhibuje jejich degradaci. TGF-beta-1 je hlavní profibrogenní cytokin (45).



Poškozené *biliární buňky* (cholangiocyty) ovlivňují HSC pomocí TNF-alfa (tumor necrosis factor alpha), endotelinu-1 a PDGF (platelet derived growth factor).

*Endotelové buňky* se účastní aktivace produkcí fibronektinu, který aktivuje HSC. Endotelie vytvářejí tzv. urokinázový aktivátor plazminogenu, který má důležitou roli při konverzi TGF-beta z latentní na aktivní profibrogenní formu.

*Kupfferovy buňky* (rezidentní makrofágy) mají významnou úlohu v aktivaci HSC. V závislosti na specifické biologické situaci a kontextu se aktivují různými způsoby a cestami (46). Prozánětlivé aktivity makrofágů zahrnují prezentaci antigenu, aktivaci T-buněk, uvolnění cytokinů a proteáz. Mezi silné činitele aktivace patří např. TGF-beta, TGF-alfa a dále reaktivní kyslíkové radikály/peroxydy (47). Významným cytokinem z produkce Kupfferových buněk je TNF-alfa (viz poškození jater alkoholem), který mj. indukuje infiltraci tkáně neutrofilů. Dalším prostředkem, kterým Kupfferovy buňky ovlivňují HSC, je sekrece matrix metaloproteinázy 9 (MMP-9), která aktivuje latentní TGF-beta (48, 49). TNF-alfa a MMP-9 se také účastní pochodů regenerace jater.

**Reaktivní kyslíkové radikály** (ROS – reactive oxygen species) a „oxidační stres“ jsou mocným podnětem k aktivaci HSC a syntéze kolagenů (50). Kupfferovy buňky jsou jejich výrazným zdrojem, ale ROS vznikají také v HSC, hepatocytech a leukocytech. Kupfferovy buňky ovlivňují HSC také tvorbou NO (oxid dusnatý), který tvoří protíváhu stimulačního vlivu ROS snížením aktivace HSC a omezením jejich kontraktility (51).

Na druhou stranu se mohou Kupfferovy buňky projevovat i protizánětlivě, aktivita je zprostředkována zejména pomocí IL-4 (interleukin 4) a dále jsou schopny indukovat imunotoleranci a diferenciaci T-buněk.

Další, nově postulovaný koncept se týká chování Kupfferových buněk během fáze rezoluce (ústupu) fibrózy. Lze se domnívat, že makrofágy hrají aktivnější roli, pravděpodobně v produkci proteáz degradujících fibrilární matrix. V poškozených játrech vedla experimentální blokáda infiltrace makrofágy k zrušení aktivace klidových HSC v myofibroblasty (52).

*Trombocyty* jsou mohutným zdrojem cytokinů a růstových faktorů a účastní se patofyziologických pochodů v nemocných játrech. Pro HSC vytvářejí nejvýznamnější mitogenní cytokin – PDGF (platelet derived growth factor), dále TGF-beta a EGF (epidermal growth factor) (53). Tvorba PDGF je zvýšena ve fibrotických játrech (54) a jeho inhibice snižuje experimentální fibrogenézi (55).

*Leukocyty*, které se akumulují v játrech během poškození, jsou dalším velkým zdrojem molekul, které ovlivňují chování HSC. Neutrofilů jsou výrazným zdrojem kyslíkových radikálů, které mají přímý stimulační vliv na syntézu kolagenu. Aktivované neutrofilů také vytvářejí molekuly NO, které alespoň částečně snižují vliv kyslíkových radikálů.

*Lymfocyty* jsou zdrojem cytokinů. Některé, včetně CD4+ T-helper (Th) buněk jsou přímo v játrech lokalizovány, ale významné množství tvoří cirkulující oddíl lymfocytů. Vliv těchto cirkulujících lymfocytů na činnost jater je veliký a zatím nedostatečně studovaný.

Rozlišují se celkově dva typy cytokinové tvorby lymfocytů – Th1 a Th2 reakce. Zjednodušeně platí, že Th1 buňky produkují cytokiny, které podporují buněčnou imunitu. Příkladem je INF-gama (interferon gamma), TNF-alfa a interleukin IL-2. Th2 buňky podporují humorální imunitu pomocí IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13. Th1 buňky

potlačují rozvoj Th2 buněk, a naopak. Reakce hostitele na infekci nebo poškození se často polarizuje buď do odpovědi Th1, nebo Th2, ale ne do obou. Obecně lze říci, že lymfocyty Th2 favorizují při poškození jater fibrogenezi (56).

Extracelulární matrix je zásobárnou růstových faktorů, např. PDGF. Řada makromolekul extracelulární matrix přenáší signály na HSC přímo, nikoliv pomocí cytokinů. Komunikují přes integriny, což jsou membránové receptory, které přenášejí poziční signály z okolí dovnitř buňky. Integriny také ovlivňují motilitu buňky.

### **Perpetuace**

Druhá fáze aktivace HSC – udržovací – zahrnuje následné buněčné aktivity:

**1. Ztráta retinoidů.** Při aktivaci HSC dochází k vymizení tukových kapének s retinoidy v cytoplazmě. Význam tohoto jevu je nejasný. Retinol je během aktivace vylučován ve formě retinolu a ne jako uložený ester. Byla také zjištěna přítomnost řady retinoidových receptorů v jádře HSC a jejich příslušné ligandy. Není známo, zda je ztráta retinoidů vyžadována pro iniciaci či udržování fibrogeneze.

**2. Proliferace.** Během časné fáze se indukuje tvorba receptorů PDGF na povrchu HSC a tím se zesiluje vnímavost k signálům tohoto schopného mitogenu. Množství HSC se výrazně zvýší během poškození jater.

PDGF-receptor patří do skupiny tzv. tyrosinkináz, které jsou významné při přenosu signálů mnoha cytokinů do HSC (např. HGF – hepatocyte growth factor, EGF – epidermal growth factor, VEGF – vascular endothelial growth factor, FGF – fibroblast growth factor). Intracelulární cesty po aktivaci PDGF receptoru zahrnují ERK/MAP kinázu, PI-3-kinázu a STAT-1 (signal transducers and activators of transcription) (57).

PDGF-ligand je nejsilnější mitogen hvězdicových buněk, mezi další mitogeny patří endotelin-1, FGF, IGF a jiné.

**3. Fibrogeneze.** Zvýšená produkce patologické ECM. Nejsilnějším stimulem k tvorbě kolagenu je TGF-beta, jehož zdroje jsou autokrinní i parakrinní. TGF-beta má ústřední úlohu ve fibrogenezi, pomáhá aktivaci zánětlivých buněk, epiteliální-mezenchymální přeměně (EMT) buněk a ovlivňuje aktivitu fibroblastů. TGF-beta přenáší signály pomocí svého transmembránového receptoru (serin/threonin kináza) a aktivuje intracelulárně tzv. Smad-proteiny, které následně ovlivňují transkripce cílových genů v jádře buňky.

Syntéza kolagenu v HSC je regulována jak na transkripčním, tak na posttranskripčním stupni (58). Klíčová tolik není zvýšená transkripční aktivita genu, jako zejména zesílená stabilita mRNA kolagenu u aktivovaných HSC. Za normálních okolností se velké množství mRNA degraduje, dříve než dojde k procesu translace v primární protein. Potranskripční regulace mRNA kolagenu je velmi dobře popsána a souvisí s aktivitou RNA-binding proteinu alfa-CP2 na 3' regionu a s tzv. stem-loop strukturou na 5' regionu mRNA kolagenu (59).

**4. Kontraktilita.** Kontrakce HSC může být hlavním faktorem časné portální hypertenze. Výběžky HSC obepínají sinusoidy a jsou schopny kontrakce, což je dáno nejspíše expresí vláken aktinu (alfa-SMA) v cytoplazmě. Tím aktivované HSC blokují tok v sinusoidách. U pokročilé cirhózy kontrakcí fibrotických sept kontrahují celá cirhotická játra. Regulace fibrogeneze se také účastní cytokiny s vazoaktivním potenciálem (60). Vazodilatační látky (NO, relaxin) mají antifibrotický efekt, substance vazokonstrikční (noradrenalin, angiotensin II) opačný (61, 62).



Hlavním kontraktilním stimulem pro HSC je endotelin-1 (ET-1, významná je úloha endotelinového receptoru A) (63, 64). Endotelinové receptory jsou tvořeny jak na klidových, tak na aktivovaných HSC. Složení jednotlivých receptorů a tím schopnost reagovat na endotelinovou stimulaci se mění během procesu aktivace HSC. Celkově se endotelinový systém v cirhotických játrech aktivuje, ale tato aktivace je velmi komplexní (65).

Angiotensin II je efektor osy renin-angiotenzin, která je hlavním regulátorem arteriálního tlaku. Významné součásti tohoto systému jsou exprimovány v chronicky poškozených játrech. Aktivované HSC vytvářejí angiotenzin II (66, 67). Farmakologická a genetická ablace systému renin-angiotenzin významně snižuje experimentální fibrózu jater (68, 69). Angiotenzin II indukuje zánětlivý infiltrát jater a stimuluje řadu profibrogenních činností aktivovaných HSC – proliferaci, migraci, sekreci prozánětlivých cytokinů a syntézu kolagenu (70). Tyto činnosti jsou ovlivňovány reaktivními kyslíkovými radikály vytvořenými oxidázou NADPH. Tento enzym je konstitutivně funkční ve fibrogenních buňkách (ale také v Kupfferových buňkách). Narušení oxidázy NADPH v experimentu významně redukuje patologickou fibrogenezi (71).

Dalšími kontraktilními a relaxačními stimuly jsou prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin E2 (PGE2) a tromboxany, které jsou tvořeny Kupfferovými buňkami. Tromboxany podporují kontrakci HSC a PGE2 relaxaci (72).

Vazodilatačním a relaxačním faktorem, působícím proti kontrakci výběžků HSC endotelinem, je plyn kysličník dusnatý (NO), který je mimo jiné zdroje také původem z HSC.

Molekulou s vazodilatačními účinky je také H<sub>2</sub>S. Tento plyn je v játrech vytvářen z cysteinu pomocí enzymu cystathion-gama-lyáza (CSE). Enzym je tvořen v klidových HSC a hepatocytech, ne však v endotelových buňkách. H<sub>2</sub>S uvolňuje kontrakci HSC. Aktivace HSC potlačí expresi CSE a tím naruší tvorbu H<sub>2</sub>S. Aktivace tak dále zesiluje schopnost kontrakce HSC a přispívá k portální hypertenzi (73).

**5. Degradace matrix.** Akumulace extracelulární matrix je výsledkem dvou procesů – zvýšené syntézy i snížené degradace (74). Vedle produkce patologické matrix vytvářejí HSC také produkty rozrušující normální ECM.

**Matrix metaloproteinázy (MMP)** jsou enzymy schopné cílené degradace kolagenů i nekolagenních komponent ECM (75). Matrix metaloproteinázy jsou vytvářeny a uvolňovány podle aktuálních potřeb (on demand) a většinou jako neaktivní enzymy. Jsou produkovány různými buněčnými typy v játrech, nejenom HSC. Neaktivní MMP jsou aktivovány proteolytickým štěpením buď jinou MMP (membránový typ MMP-1), nebo plazminem. Inhibovány jsou naopak vazbou na tzv. **tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP 1–3)**. Výsledná aktivita kolagenáz je pak dána relativním poměrem aktivních MMP a jejich inhibitorů TIMP.

V počátcích jaterního poškození dochází k degradaci normální subendotelové matrix. Musí ustoupit nové tvorbě. Podstatnou součástí původní zdravé nefibrilární matrix je kolagen IV. typu (komponenta bazálních membrán obecně), který je rozrušován pomocí MMP-2 a MMP-9. HSC vytvářejí matrix metaloproteinázu-2 (MMP-2, gelatináza A), jejíž latentní forma je aktivována MMP-1 a MMP-2. Matrix metaloproteinázu-9 (MMP-9, gelatináza B) uvolňují Kupfferovy buňky. Celkově dochází k poklesu proteázové aktivity a tím k posunutí rovnováhy výrazně ve prospěch akumulace ECM (76).

Jiné metaloproteinázy (MMP-1,-8,-13) mají naopak schopnost degradovat patologickou fibrilární ECM, a jsou proto inhibovány pomocí TIMP. Uplatňují se v období regrese jizvy, kdy se inhibitory (TIMP) uvolňují z vazby.

**6. Migrace HSC a chemotaxe.** HSC mohou migrovat směrem k chemoatraktantům. Schopnost migrace HSC získají svojí transformací v myofibroblasty a souvisí s rozvojem aktinových a myozinových intracelulárních filament (77). Migrace namnožených HSC vysvětluje jejich lokalizaci podél zánětlivých sept (78). Hlavním chemoatraktantem je MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (79).

**7. Chemoatrakce leukocytů a cytokiny.** Kromě úlohy při vytváření matrix se HSC účastní regulace zánětlivých procesů během jaterního poškození. HSC produkují řadu chemokinů, včetně MCP-1, MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) a cytokine-induced neutrophil chemoattractant/IL-8 (80, 81). Exprimují receptory pro chemokiny a tím se stávají senzitivní na jejich signalizaci.

Předpokládá se, že chemokiny stimulují a vyvolávají migraci HSC k místu poškození a následně HSC atrahují leukocytární infiltrát do stejné lokalizace (82). Nález infiltrátu je typickým rysem v histologii fibrotických jater (83, 84). Tento koncept je v souladu se současným nálezem exprese MCP-1 ve fibrózních septech a v mononukleárním infiltrátu u nemocných s chronickou hepatitidou C (85). Samotný leukocytární infiltrát je poté důležitým a bohatým zdrojem chemokinů a růstových faktorů, které zpětně podporují aktivaci a proliferaci HSC. Tudíž mohou chemokiny uvolňované z HSC být součástí celého přediva a sítě vazeb cytokinů v játrech, které upravují vztahy rezidentních a nonrezidentních buněk během jaterního poškození. Tuto hypotézu podporuje také fakt, že HSC vytvářejí molekulární nástroje k interakci s infiltrujícími leukocyty (ICAM, VCAM a CD40), jsou schopny prezentace antigenu a stimulace proliferace alogenních lymfocytů (86, 87, 88). Uvolňování chemoatraktantů a cytokinů je tudíž nezbytné pro autokrinní a parakrinní perpetuaci aktivace hvězdicových buněk.

Při poškození tkáně ovlivňují cytokiny, které regulují zánětlivou odpověď, také jaterní fibrogenézi *in vitro* a *in vivo*. MCP-1 a RANTES (CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed, and presumably secreted) stimulují fibrogenézi, zatímco IL-10 a INF-gama mají opačný vliv (89).

Protizánětlivý cytokin **interleukin-10** (IL-10) snižuje fibrogenézi v kulturách HSC poklesem syntézy kolagenu a zvýšením tvorby kolagenázy (90). Transgenní myš s vyšší produkcí IL-10 měla potlačenou fibrogenézi. Vyšší tvorba IL-10 byla zjištěna zvláště v počátcích aktivace HSC. Snižuje tvorbu TNF-alfa v makrofázích.

Zatím nedostatečná pozornost byla věnována vlivu jednotlivých podtypů lymfocytů na fibrogenézi. Lymfocytární fenotyp může hrát roli při rychlé fibrotizaci u koinfekce HIV/HCV a u nemocných s hepatitidou C po transplantaci jater.

**Adipokiny** jsou cytokiny, které jsou vytvářeny zejména v tukové tkáni. Ovlivňují ovšem také fibrogenézi. Leptin je nutný k řádné aktivaci HSC a k tvorbě fibrózy (91). Je i velmi silným mitogenem HSC, snad srovnatelný i s PDGF. Má také antiapoptotický účinek na HSC (92). Opačně účinkuje adiponektin, který inhibuje fibrogenézi *in vitro* a *in vivo* (93). Aktivita těchto cytokinů by mohla vysvětlit, proč má obezita takový vliv na tvorbu fibrózy u nemocných s hepatitidou C (94).

**Kanabinoidy**, jak exogenní, tak endogenní, působí prostřednictvím dvou typů receptorů – CB1 a CB2. Aktivace receptoru CB1 snižuje arteriální tlak, zvýší průtok v mezenterální žíle a zvýší tlak v portální žíle. Antagonisté CB1 tento účinek u cirhotických krys blokují. Množství receptorů CB1 stoupá u lidských cirhotických jater a jsou zvýšeně vytvářeny v aktivovaných myofibroblastech. Farmakologická a genetická blokáda receptorů CB1 vedla k omezení fibrotizace jater u několika zvířecích mode-

lů (95). Studuje se možný antifibrotický vliv receptoru CB2. U jaterní cirhózy je také zvýšena hladina endogenního kanabinoidu anandamidu, který může mít úlohu v regulaci fibrózy (96). Pravidelné užívání exogenního kanabису (*Cannabis sativa*, marihuana) ovšem urychlilo progresi fibrózy u pacientů s chronickou hepatitidou C (97).

Receptory adenosinu A2A jsou vytvářeny na HSC a mají profibrogenní účinek. Laboratorní myši, kterým byl tento receptor odstraněn, jsou při poškození jater CCl4 rezistentní na vznik fibrózy. Obdobně kofein (neselektivní antagonist adenosinového receptoru) omezil profibrotický vliv CCl4 a thioacetamidu (98).

### 1.2.4 Intracelulární signalizace

Naše znalosti o intracelulárních pochodech jsou odvozeny hlavně ze studií využívajících buněčné kultury hvězdicových buněk. Dalším zdrojem informací jsou knockoutované myši. Jsou vhodné k zhodnocení údajů získaných z kultur. Knockoutovaný gen je gen záměrně inaktivovaný zmutovanou alelou u jinak zdravého organismu.

Dramatické změny fenotypu HSC během aktivace vyžadují výrazné přeprogramování exprese mnoha genů. V jádře savčích buněk je transkripce genů ovlivněna vazbou tzv. transkripčních faktorů na specifické úseky DNA v oblasti genu zvané promoter. Naváže-li se transkripční faktor na úseky promoteru, dostane se do blízkosti RNA-polymerázy a s ní spojených komponent. Transkripční faktor je pak schopen svojí vazbou ovlivnit pozitivně nebo negativně transkripční příslušného genu.

Další kontrola transkripce se odehrává na úrovni kontroly tvorby transkripčních faktorů samotných. Buď ovlivněním jejich genové exprese, nebo rychleji posttranslačně, tj. na úrovni vytvořeného proteinu – acetylací, fosforylací, ubiquitinací a interakcí se specifickými inhibitory či koaktivátory (99). (Ubiquitinace – intracelulární degrační proces, při kterém se na bíkoviný substrát naváže jeden nebo více regulačních proteinů – ubiquitinů – a zahájí se proteolýza substrátu. Nobelova cena za chemii za rok 2004.)

Jednotlivé intracelulární signální faktory a jejich pochody jsou koordinovány v komplikovanou síť vztahů, která je ovlivňována extracelulárními podněty. Tím se upravuje fenotyp HSC podle potřeby pro dané prostředí a situaci (100). Mezi studované intracelulární faktory HSC patří:

- NF kappa B. Nukleární faktor kappa B, klíčový faktor mnoha buněk, je vázán se svým inhibitorem I kappa B. Podporuje přežití aktivovaných HSC a jejich proliferaci. NF kappa B působí ochranně proti TNF-alfa indukované apoptóze HSC (101). Naopak NF kappa B inhibitor **gliotoxin** působí *in vivo* regresi fibrózy stimulací apoptózy HSC (102). Účastní se také pochodu ovlivňujících regeneraci jater.
- AP-1. Změny v expresi a aktivitě různých forem AP-1 (active protein-1) ovlivňují změny produkce MMP a TIMP (103).
- KLF. Kruppel-like faktory. Aktivované HSC vytvářejí alespoň tři druhy KLF, všechny ovlivňují regulaci transkripce alfa1(I) kolagenu (104).
- C/EBP. Skupina CCAAT/enhancer binding proteinů (C/EBP) transkripčních faktorů reguluje gen pro alfa1(I) kolagen (105).
- E-box a bHLH. Do skupiny faktorů bHLH (basic helix-loop-helix) patří faktor MyoD, jehož aktivní forma ovlivňuje kontraktilitu aktivovaných HSC. Může spus-

tit diferenciaci fibroblastů v buňky kosterního svalstva. E-box faktory reguluje gen pro M6P/IGFIIIR (mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor) (106). Receptor váže latentní TGF-beta na povrchu HSC, a stimuluje tak fibrogenezi.

- cMyb. Velmi široká skupina transkripčních regulátorů, které ovlivňují mnoho genů. U hvězdicových buněk jsou vyžadovány k transkripci genu pro alfa-SMA (107).
- Lhx2. LIM homeobox gene 2. Transkripční faktor, který může mít význam při udržení klidového neaktivovaného stavu HSC (108). Myší embryo deficientní v genu Lhx2 vytvoří fibrotická játra.
- PPAR-gama. Doposud jmenované transkripční faktory byly spojeny s aktivovanými HSC. PPAR-gama (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) je členem skupiny steroidních a thyreoidálních nukleárních receptorů. Reguluje transkripci genů a buněčnou diferenciaci vazbou s retinoid-X-receptorem. Je exprimován v klidových HSC a během aktivace jeho exprese dramaticky klesá (109). PPAR-gama agonisté blokují řadu fenotypických rysů aktivovaných HSC – PDGF indukovanou proliferaci, syntézu DNA, chemotaxi a expresi alfa-SMA, alfa1(I) kolagenu a MCP-1 (110). Tento účinek byl blokován užitím PPAR-gama antagonisty. Podařilo se úspěšně zopakovat tyto studie u lidí, pak slibují velkou naději v léčbě fibrózy a cirhózy.
- PPAR-beta. Aktivované HSC mají zvýšenou expresi PPAR-beta aktivačního faktoru, který podporuje oxidaci mastných kyselin. Adipogenní transkripční regulace je nutná k udržení HSC ve klidovém stavu (111).
- Smad. Soubor signálních proteinů, které přenášejí a regulují signalizaci z TGF-beta receptorů I a II na povrchu buňky směrem do jádra. Mohou být cílem event. terapeutických pokusů (112).
- Hedgehog signalizace. Signalizační cesta (Hh-signalizace) významná jak pro embryonální vývoj, tak pro období dospělosti. V embryonálním období je nezbytná k zrání mezenchymálních buněk. Deficientní Hh-signalizace vede k narušení embryogeneze, naopak zvýšená Hh-signalizace je spojena s dědičným sklonem k nádorům (Gorlinův syndrom). Je nutná k diferenciaci střevního nervového systému a k správnému vývoji střevních krypt. Je součástí mechanismu přeměny neaktivních HSC v aktivní myofibroblasty. Zároveň je možné, že antifibrotický účinek rapamycinu souvisí také s ovlivněním Hh (113).

Intracelulární pochody, které jsou velmi spletité, se také velmi obtížně luští. Možné budoucí nálezy odhalí přesnější mechanismy regulace HSC, a tak umožní cílenou manipulaci nutnou k vývoji nových léků.

### 1.3 Genetické faktory fibrózy

Rozsáhlé studie odhalily některé klíčové geny regulující fibrózu jater (viz tabulka 1.2). Genetické studie dále zjišťovaly význam polymorfizmů genů jednotlivých fází jaterní fibrogenese (114). Poruchy funkce těchto genů mohou ovlivnit rozsah celkového poškození.

Polymorfizmy genů regulující hepatocelulární apoptózu a nekrózu (např. Bcl-xL, Fas) mohou ovlivnit rozsah poruchy během poškození a následnou fibrogenní odpověď. Geny regulující zánětlivou odpověď (IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-gama, SOCS-1, osteopontin) se podílejí na fibrogenní reakci (115). Geny zprostředkující

tvorbu ROS (např. NADH-oxidáza), ovlivňují jak zánět, tak ukládání ECM (116). Pro rozvoj fibrózy jsou nutné fibrogenní faktory (např. TGF-beta), vazoaktivní substance (např. angiotenzin II) a adipokiny (leptin a adiponektin). Po odeznění vyvolávajícího poškození je přesně řízené odstranění nadbytečného kolagenu.

Ovlivnění faktory prostředí a schopnost reagovat na vnější vlivy je také spoluurčeno geneticky. Kandidátské geny u alkoholické choroby jater (ALD) se účastní metabolismu alkoholu. Polymorfizmy alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy a cytochromu P-450 ovlivňují individuální vnímavost vůči toxickým projevům alkoholu (117). Jejich role v patogenezi alkoholické nemoci jater je ovšem nejasná. Změny v genech ovlivňujících zánětlivé mediátory (TNF-alfa, IL-1beta, IL-10 a CTLA-4), genu pro lipopolysacharidový receptor (CD14/Toll-like receptor 4) a pro antioxidanty (např. superoxidodismutáza – SOD) můžou mít také svoji roli v progresi ALD.

U chronických cholestatických chorob jako primární biliární cirhóza (PBC) jsou polymorfizmy v IL-1beta, IL-1 receptor antagonistech a TNF-alfa genech spojeny s rychlejší progresí (118). Některé alely genu apolipoproteinu E ovlivňují odpověď na léčbu PBC ursodeoxycholovou kyselinou, což by mohlo znamenat, že genetické polymorfizmy mohou předpovídat terapeutickou účinnost (119).

Během chronické hepatitidy C genetické varianty ovlivňují vnímavost k perzistenci infekce, odpověď na protivirovou léčbu a progresi jaterní choroby (120). Fibrózu ovlivňují polymorfizmy genů zúčastněných v imunní odpovědi na HCV (např. přenašeč nutný k prezentaci antigenu TAP-2, mannose-binding lectin, specifické HLA alely) a genů fibrogenních agonistů (angiotenzinogen, TGF-beta) (121, 122). Vliv C282Y mutace HFE-genu na hereditární hemochromatózu u nemocných s infekcí virem hepatitidy C je nejasný (123).

Málo je známo o genetických faktorech a NASH (nealkoholická steatohepatitida), spekuluje se o různých fibrogenních mediátorech (124). Možná role adipokinů již byla zmíněna.

Při dodržení striktních pravidel výzkumu v kontrolních studiích nebyla řada předpokládaných genových asociací, možných mutací či polymorfizmů nakonec potvrzena. Tato přísná opatření jsou nutná k zamezení falešného výkladu náhodných spojení. Ve skutečnosti se mohlo jednat o nesprávné funkční pozorování nebo studie nebyla řádně statisticky zpracována.

### **Nové metody výzkumu**

Zatím se výzkum převážně soustředil na jednotlivé, tzv. kandidátské geny za kontroly na zdravých zvířatech. Jednalo se o tzv. přístup „gen-to-phenotype“. K ověření hypotézy významu nějakého genu při vzniku fibrózy jater bylo třeba odhalit funkčnost genu pomocí knockautovaných nebo transgenních zvířat. Nyní se přístup obrátil. Vyšetření tisíců až desetitisíců genů najednou umožňuje změnu celé strategie detekce genů spojených s určitým fenotypickým jevem. Jedná se o přístup „phenotype-to-gene“. Je možné začít u zajímavého fenotypu bez znalosti genetických determinant a určit odpovědné geny a metabolické cesty. Tím lze namísto validace funkčnosti hypotézy odhalit geny doposud neznámé (125). Jedná se o metody tzv. funkčního genomiku (functional genomics). Některé nevyžadují předchozí znalost genové sekvence (tzv. otevřené systémy), jiné tuto znalost vyžadují (uzavřené systémy) (126).

Mezi techniky s otevřenou architekturou řadíme SAGE (serial analysis of gene expression), RDA (representational differences analysis) a DD (differential display).