

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 společně

*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

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

1 Fibróza jater (patogeneze, diagnóza, terapie)

Pavel Taimr

| | | |
|--------|--|-----------|
| 1.1 | Fibróza a cirhóza | 7 |
| 1.2 | Patofyziologické mechanizmy fibrózy jater | 8 |
| 1.2.1 | Extracelulární matrix | 9 |
| 1.2.2 | Buněčné zdroje extracelulární matrix v normálních a fibrotických játrech | 11 |
| 1.2.3 | Aktivace jaterních hvězdicových buněk a extracelulární 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 |
| | Literatura | 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 pokradný, 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 hvězdčové 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 usídlení buněk 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).

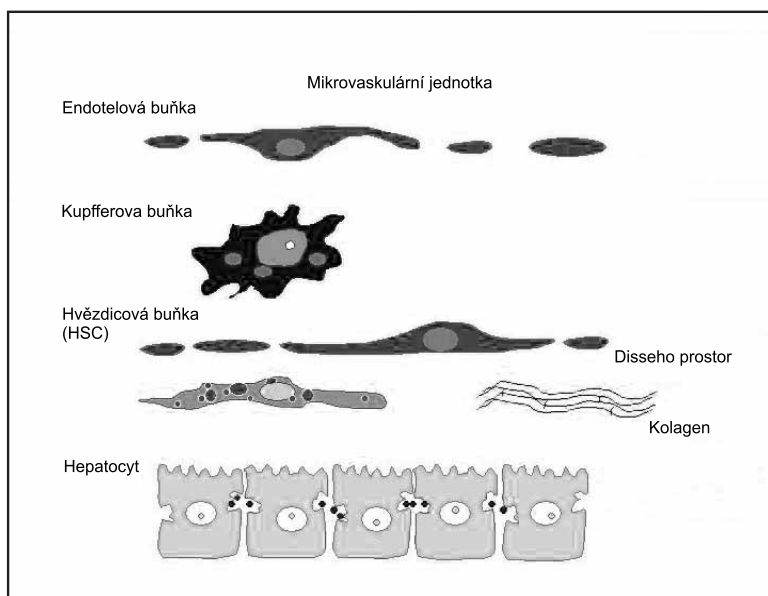
V cirhotických játrech dochází k syntetické i metabolické dysfunkci (21) a narušení transportů řady látek ze sinusoid k hepatocytům (22).

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 | + | | +++ | |

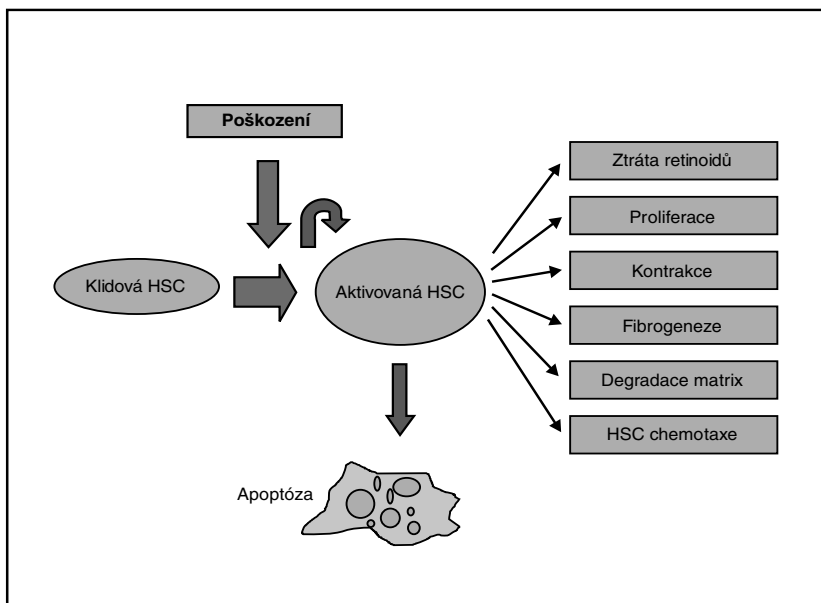


Obr. 1.1 Jaterní sinusoid

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 krysách a také byly připraveny kmeny transgenických 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- γ , leptin, aj.). Aktivované HSC vytvářejí také myogenní markery (zejména vlákna hladkého svalu v cytoplazmě - α -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 α -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 tkáně.

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 markerech 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 tělíska 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 pochodu 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 protiváhu 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 postižených 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 H₂S. 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. H₂S uvolňuje kontrakci HSC. Aktivace HSC potlačí expresi CSE a tím naruší tvorbu H₂S. 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.