

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, umísťování 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.



Copyright © Grada Publishing, a.s.

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

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 mechanismy 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 shunt). 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 poškozením. 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.

Poškození 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 časně akumulaci jizvy.

Základní procesy vedoucí k fibrotizaci různých orgánů jsou si podobné bez ohledu na původ poškození a akcelerovaná fibrogenese 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).

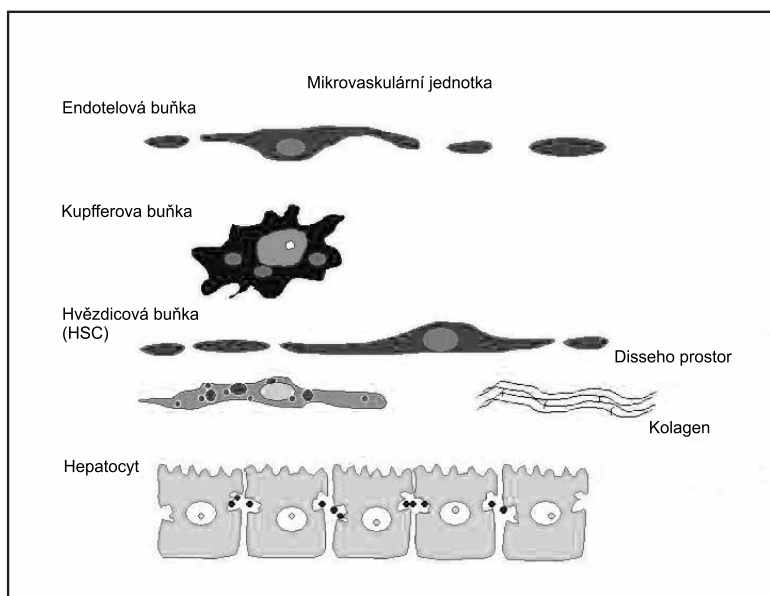
V cirhotických játrech dochází k syntetické i metabolické dysfunkci (21) a narušení transportů řady látek ze sinusoid k hepatocytům (22).

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	+		+++	

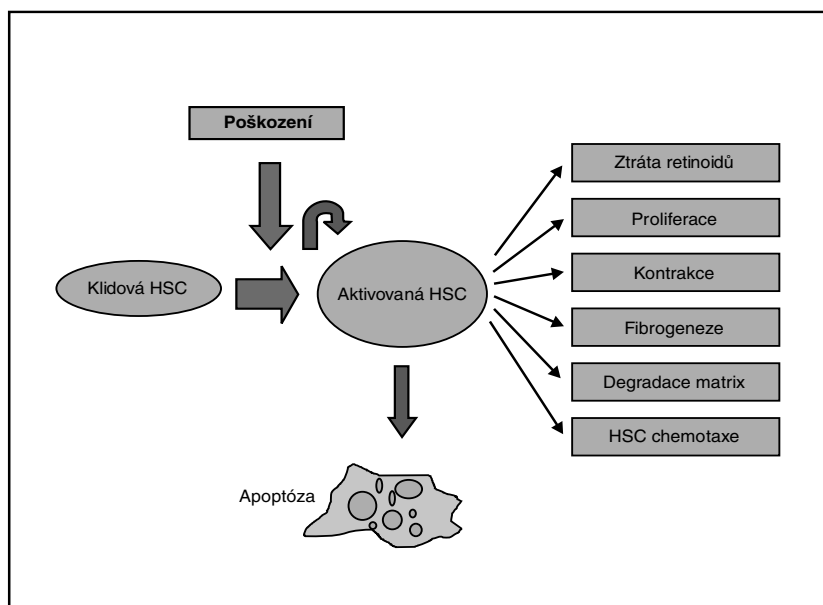


Obr. 1.1 Jaterní sinusoid

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 cytoplasmě 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 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 větěnovitým 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 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 inter-face 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 steatohepatitidou, 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 produkci 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/peryoxidy (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 makrofágů 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 cytoplasmě. 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 časně 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 hvězdčicových 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 časně portální hypertenze. Výběžky HSC obepínají sinusoidy a jsou schopny kontrakce, což je dáno nejspíše expresí vláken aktinu (alfa-SMA) v cytoplasmě. 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 fibrogenезi (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.

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 hvězdčkových buněk.

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

Protizánětlivý cytokin **interleukin-10** (IL-10) snižuje fibrogenезi v kulturách HSC poklesem syntézy kolagenu a zvýšením tvorby kolagenázy (90). Transgenní myš s vyšší produkcí IL-10 měla potlačenou fibrogenезi. 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 fibrogenезi. 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 fibrogenезi. 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 fibrogenезi *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, zvyšuje průtok v mezenterální žíle a zvyšuje 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 promóter. Naváže-li se transkripční faktor na úseky promóteru, dostane se do blízkosti RNA-polymerázy a s ní spojených komponent. Transkripční faktor je pak schopen svojí vazbou ovlivnit pozitivně nebo negativně transkripci 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 degra-dační proces, při kterém se na bíkovinný 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 pochodů 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). Myši 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. Podaří-li 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. superoxiddismutáza – 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).

Techniky s uzavřenou architekturou zahrnují např. gene array analýzu. Metodiky produkují obrovská množství nových dat, které je velmi obtížné zpracovávat.

Metoda QTL (quantitative trait loci) takto například odhalila další možný lokus ovlivňující fibrózu jater – gen Hc kódující faktor 5 komplementu. Technika QTL mapping kvantitativně a statisticky zpracovává oblasti celého genomu, které jsou buď shodné, nebo se liší mezi inbredními krysami, z nichž u jedné části souboru byla navozena fibróza jater (127).

V rámci vyšetření celého genomu umožní moderní technologie výhledově u pacienta studovat polymorfizmy jednotlivých nukleotidů (SNP – single nucleotide polymorphism).

I když se převážná většina aplikací věnuje základnímu výzkumu jaterních chorob (studium signálních cest, odhalení nových onkogenů/tumor supresor genů, atd.), tak klinické využití těchto technologií začíná pronikat do praxe. Například specifické skupiny genů mohou poskytnout informaci o prognóze úspěšnosti onkologické léčby a poté její monitoraci. Celkem realisticky můžeme očekávat, že v nejbližší budoucnosti bude součástí jaterní biopsie profilace exprese genů (tzv. „fingerprinting“ neboli typický nález u dané choroby) a také molekulární diferenciální diagnostika (např. hepatocelulární karcinom či dysplastický cirhotický uzel).

Využití molekulárně biologických metod je vhodné pouze při splnění řady podmínek. Nejdůležitější je, že technologie a její výsledky musí být reprodukovatelné v laboratořích jiných center, nejlépe nejenom univerzitních, ale i v menších nemocnicích nebo třeba v komerčních zařízeních. Dále musí molekulární vyšetření poskytnout klinicky významnou informaci, kterou není možné získat tradičními metodami. A tato informace by měla být dosažitelná včas. Neméně důležitá bude také cena vyšetření.

1.4 Patogeneze fibrózy u různých jaterních chorob

Patogeneze jaterní fibrózy v mnoha aspektech závisí na základním onemocnění. I když jsou základní mechanismy analogické, přesto je každá ze základních chorob ve svém mechanismu poškození jater jedinečná.

Alkoholická nemoc jater je ovlivněna vlivem alkoholu na střevní flóru. Zpomalení střevní motility etanolem a změny v bakteriální populaci vedou k namnožení Gram-negativních bakterií. Jimi vytvářený endotoxin (lipopolysacharid, LPS) proniká střevní sliznicí do portálního řečiště a aktivuje Kupfferovy buňky pomocí CD14/Toll-like receptor-4 komplexu (TLR4, viz také regenerace) (128). Kupfferovy buňky vytvářejí ROS (NADPH-oxidázou) (129). Kyslíkové radikály dále přes NF kappa B zvýší produkci TNF-alfa, který indukuje hromadění neutrofilního infiltrátu a stimuluje další tvorbu ROS v mitochondriích hepatocytů. Acetaldehyd přímo aktivuje HSC a vyvolává zánětlivé a fibrogenní signály (130).

Patogeneze fibrózy indukované virem **hepatitidy C** není příliš prozkoumaná, chybí vhodný zvířecí model. Hepatitida C infikuje hepatocyty a způsobuje oxidativní stres a indukci zánětlivých buněk. Oba faktory vedou k aktivaci HSC.

Některé proteiny viru hepatitidy C jsou schopny přímo stimulovat fibrogenní aktivitu HSC (131). Glykoprotein E2 obalu viru hepatitidy C se váže na receptor CD81 membrán cílových buněk (např. hepatocytů). CD81 je také exprimován na membráně HSC a je scho-

pen vazby s E2 s následnou vyšší tvorbou MMP-2. Nelze vyloučit, že virus hepatitidy C může přímo infikovat hvězdicové buňky jater a působit profibrogenně (132).

U **chronické cholestázy** vytvářejí biliární buňky fibrogenní mediátory, aktivující místní portální fibroblasty, které vytvářejí produkty ECM. Následně jsou do procesů zavzaty perisinusoidální HSC a začnou se vytvářet fibrotické pruhy (133). V aktivaci se účastní i T-lymfocyty.

Patogeneze **NASH** není příliš známá. Sdružuje se s obezitou, diabetem mellitus II. typu a poruchou metabolismu tuků. Předpokládáme několikastupňovou poruchu (2 hit model); nejdříve dochází k vzniku inzulinové rezistence a hyperglykémii, výsledkem je steatóza jater. V dalším stupni dochází k tvorbě oxidačního stresu, apoptóze hepatocytů a tím spuštění zánětlivých reakcí s postupnou fibrotizací (134). Leptin, cirkulující adipogenní hormon, je prokazatelně spojen s aktivitou HSC a fibrogenézí. Choroba není (zatím) v České republice příliš často diagnostikována.

Tab. 1.2 Genetické a negenetické faktory spojené s progresí fibrózy jater (Battaller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 2005, 115, 2, 209–218.)

Typ jaterní choroby	Kandidátský gen		Negenetické faktory
	Zkráceně	Plný název	
Chronická hepatitida C	HFE	Gen hereditární hemochromatózy	Alkohol
	Angiotensinogen	Angiotenzinogen	Koinfekce HBV
	TGF- beta1	Transforming growth factor beta 1	Koinfekce HIV
	TNF- alfa	Tumor necrosis factor alpha	Věk pacienta při začátku HCV
	Apo E	Apolipoprotein E	Transplantace jater
	MEH	Microsomal epoxide hydroxylase	Diabetes mellitus
	MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1	Non respondent na léčbu
	MCP-2	Monocyte chemotactic protein 2	
	Factor V	Faktor V (Leiden)	
Alkohol	IL-10	Interleukin 10	Alkohol
	IL-1 beta	Interleukin 1 beta	Epizody alkoholické hepatitidy
	ADH	Alkoholdehydrogenáza	
	ALDH	Aldehyddehydrogenáza	
	CYP2E1	Cytochrome P450, 2E1	
	TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	

(pokračování tabulky na následující straně)

Typ jaterní choroby	Kandidátský gen Plný název		Negenetické faktory
	CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4	
	TAP2	Transporter-associated antigen-processing type 2	
	MnSOD	Manganese superoxide dismutase	
NASH	HFE	Gen hereditární hemochromatózy	Věk pacienta
	Angiotenzinogen	Angiotenzinogen	Stupeň obezity
	TGF-beta1	Transforming growth factor beta 1	Diabetes mellitus Hypertriglyceridemie
PBC	IL-1 beta	Interleukin 1 beta	
	TNF- alfa	Tumor necrosis factor alpha	
	ApoE	Apolipoprotein E	
Autoimunní hepatitida	HLA-II	HLA II haplotyp	Non respondent na léčbu

Poznámka: HCV – virus hepatitidy C, HBV – virus hepatitidy B, NASH – nealkoholová steatohepatitida, PBC – primární biliární cirhóza.

1.5 Vaskulární změny u cirhózy

Pro přeměnu fibrotické tkáně v cirhotickou jsou vedle masivní fibrotizace významné cévní změny a uzlovitá regenerace. Intrahepatální angiogeneze se objevuje v souvislosti s řadou zánětlivých, fibrotických a ischemických poruch jater. Není zcela jasné, zda angiogeneze představuje homeostatický mechanismus, který má za úkol zajistit přiměřenou dodávku kyslíku do hypoxických tkání, nebo zda představuje další patogenetický faktor, který přispívá k poškození jaterních buněk (teorie zdravého hepatocytu). V případě potvrzení negativní role může být angiogeneze využita jako další prognostický ukazatel jaterní choroby. Zároveň může v budoucnu být cílem terapeutických zákroků.

Vaskulární struktury v cirhotických vazivových septech (porto-systémové zkraty) se mohou vytvořit dvěma způsoby. Některé cévy pocházejí ze sinusoidů, které přetrvávají v oblastech postnekrotického kolapsu základního nosného pletiva. Ostatní se vytvoří ve fibrotické tkáni angiogenezí *de novo*. Stimulem zde může být hypoxie parenchymu při cévních zkratech nebo kapilarizaci sinusoid. Další vaskulární změny mohou souviset s tvorbou trombů ve středních portálních a jaterních žilách. Z tohoto pohledu je vlastně cirhóza vaskulární chorobou jater.

Význam teorie kapilarizace sinusoid na mikrovaskulaturu cirhotických jater byl ovšem nedávno významně zpochybněn (135). Ke kapilarizaci dochází nejspíše pou-

ze v okolí portálních polí a velkých sept. Ušetřena je zřejmě tkáň regeneračních uzlů.

Změny ve struktuře jater vedou k narušení zonálního metabolického uspořádání jater, k morfologickým a kvantitativním změnám mikrovaskulatury a k redukci styčné plochy mezi sinusoidy a hepatocyty, vhodné pro metabolickou výměnu.

Většina molekulárních mechanismů angiogeneze v játrech je stejná jako u ostatních orgánů. Přesto možné odlišnosti vyplývají jednak z dvojí mikrovaskulatury jater. Portální řečiště, stejně jako arteriální a venózní, jsou vystlána kontinuální vrstvou endotelových buněk, avšak sinusoidy mají endotelie nepravidelné a s fenestracemi; jednak z tvorby proangiogenních faktorů specifických pro játra jako AN-GPTL-3, který má afinitu k α v β 3 integrinu; a konečně z existence HSC, které mohou přispívat k angiogenezi jinými mechanismy než mikrokapilární pericyty. Fyziologická angiogeneze v játrech vede k novotvorbě sinusoid, kdežto patologická v terénu fibrózy vytváří kapilarizované cévní struktury (136).

DNA array analýza diferencované exprese genů v lidských cirhotických játrech potvrdila u řady chorob (chronická hepatitida C, autoimunní hepatitida, primární biliární cirhóza, primární sklerozující cholangitida) zvýšenou aktivaci řady klíčových genů procesu angiogeneze. Mezi tyto geny různých fází angiogeneze patří růstové faktory a jejich receptory (VEGF, HGF, FGF-8, FGF-receptor 1), adhezivní molekuly (integriny, beta-katenin), matrix remodelující molekuly (PAI-3), molekuly ovlivňující polaritu a vaskulární diferenciaci (efriny) a další (137).

1.6 Regenerace jater

Součástí obrazu cirhózy jater jsou také regenerační uzly, tj. lokální proliferace hepatocytů ohraničená fibrózními septy. Regenerace jaterní tkáně je téma natolik komplikované a samostatné, že zde odkazují na publikované přehledné práce (138, 139). Přesto je vhodné pro pochopení složitosti mechanismů při jaterní cirhóze uvést zde alespoň některé základní jevy.

Regenerace jater je vlastně kompenzační hyperplazie jater. Z biologického pojetí se nejedná o regeneraci, tj. náhradu celé struktury, která byla odstraněna (např. končetiny mlaka s kůží, svaly a prsty). Také mechanismy jsou zde jiné. U jater odstraněná část strukturálně nedoroste do podoby před zákrokem, nýbrž zbylý jaterní parenchym expanduje z důvodu náhrady ztracené funkce.

Hlavním zdrojem našich znalostí o regeneraci jater je model dvoutřetinové hepatektomie (z roku 1931). V tomto modelu pocházejí nové hepatocyty z replikujících se zbylých hepatocytů. Progenitorové buňky zde nejsou aktivovány.

Regenerace u akutního jaterního selhání souvisí naopak více s diferenciací progenitorových buněk. Rozsah účasti progenitorových buněk závisí na charakteru poškození jater, toxické dávce apod. Progenitorové buňky jsou přítomny i u chronických jaterních chorob, ale jejich podíl na repopulaci jater je zatím neznámý. Nevíme také, jaká je replikativní schopnost hepatocytů u jaterní cirhózy a zda dochází k „replikativnímu stárnutí“ cirhotických hepatocytů. V experimentu jsou normální hepatocyty schopné až osmdesáti mitotických dělení (140). Pravděpodobně odlišný je původ regenerujících neparenchymových buněk, až 20 % může být původem z kostní dřeně (141).

Zdravé hepatocyty jsou většinou v klidovém stavu G0, tj. nereplikují. Po částečné hepatektomii se aktivují, vstoupí do mitotického cyklu a do několika dní doplní chybějící tkáň. Regenerace je řízena vzájemně se ovlivňujícími pochody cytokinů, růstových faktorů a metabolických cest.

Po resekci se hepatocyty vybudí z fáze G0 do G1 (duplikace chromozomů) a S (syntéza DNA) (142). Maximální syntézy DNA dosáhnou 36 hodin po resekci. Přechod buněk, které již replikovaly DNA (G2 buňky) do fáze mitózy (M) se odehrává v závislosti na cirkadiánním rytmu. Vstup hepatocytů do fáze M závisí na poklesu tvorby WEE1 proteinu, který je periferní součástí vnitřních hodin savců. Jeho produkce osciluje a je řízena z mozku (*nucleus supraschiasmaticus*) (143).

Jednotlivé pochody regeneračního cyklu a jejich hlavní představitelé (144):

1. Cytokiny a iniciace. Jejich význam je hlavně v zahájení regenerace (z G0 do G1 fáze cyklu). Cytokinová kaskáda začíná vazbou TNF-alfa (tumor necrosis factor alfa) na receptor TNFR1 v Kupfferových buňkách. Dochází k aktivaci NF-kappa B (nukleární faktor kappa B) a následně k tvorbě IL-6 (interleukin 6). IL-6 se uvolní do okolí buňky a váže se na vlastní receptor v hepatocytech. Intracelulárně aktivuje STAT-3, který se přesune do jádra hepatocytu a zde působí na řadu genů odpovědných za regeneraci. Zmíněné cytokiny jsou plně aktivní již 30 minut po resekci (zpravidla tedy dříve než např. pacient po hemihepatektomii opustí operační sál). Počáteční tvorba TNF-alfa (a tím spuštění regenerace) je ovlivněna lipopolysacharidem (LPS, endotoxin) a jeho vazbou na Toll-like receptor 4 (CD14/TLR4, viz také poškození jater alkoholem).

2. Růstové faktory a progresse buněčného cyklu. Dochází k stimulaci dvou významných receptorů na membráně hepatocytů – c-met a EGFR. Ligandem pro první je HGF (hepatocyte growth factor), pro druhý je ligandů více – EGF (epidermal growth factor), TGF-alfa (transforming growth factor alpha), HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor) a AR (amphiregulin). Oba receptory jsou tzv. tyrosin kinázy. Následně jsou aktivovány četné intracelulární metabolické cesty, které regulují transkripční faktory a iniciují translaci.

Prekurzor HGF – proHGF – pochází z jaterních hvězdicových buněk (HSC) a před vazbou na c-met se aktivuje pomocí uPA (urokinázový aktivátor plazminogenu).

Některé z intracelulárních signalizací jsou společné oběma cestám – růstových faktorům i cytokinům – API, JNK, ERK1/2.

Primárními mitogeny hepatocytů, schopnými indukovat replikaci, jsou ligandy řady jaderných receptorů – tyroxin, TCPOBOP a retinoová kyselina.

3. Metabolické cesty a regulace. Regenerace jater je přesně modulována potřebou jaterní funkce organismu. Kritickým místem, kde se stýkají nutriční a energetické potřeby organismu s mitogenními signály, je fáze translace proteinů v hepatocytech. Součástí integrujícího složitého senzoru je mTOR, bílkovina regulující translaci a růst buněk v závislosti na přítomnosti živin. mTOR je inhibován rapamycinem (lék využívaný v transplantologii) (145).

Při ukončení regenerace v modelu parciální hepatektomie se uplatňují TGF-beta (původem z HSC), PAI (plasminogen activator inhibitor), SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling – 3) a tzv. inhibitory cyclin-dependentních kináz.

Během regenerace dochází také k přechodnému potlačení proapoptotické signalizace.

TNF-alfa také aktivuje tkáňové matrix metaloproteinázy (MMP), které jsou poté schopny degradovat součásti extracelulární matrix a tím umožní proliferaci hepatocy-

tů. Existuje vzájemné propojení a ovlivnění TNF-alfa, EGFR a MMP. Bez remodelace matrix pomocí MMP v experimentu nebyly možné další mitózy hepatocytů (146).

Téma regenerace jater je propojeno s tématem jaterní fibrózy a cirhózy. Zatím máme jen velmi omezené znalosti, do jaké míry jsou jednotlivé fyziologické mechanismy regenerace narušeny v cirhotických játrech a jak se liší od modelu parciální hepatektomie.

Pochopení procesů regenerace je také důležité při vývoji nových antifibrotických léků.

1.7 Reverzibilita fibrózy jater

Paradigma je soubor základních koncepcí a přesvědčení, jež jsou v dané chvíli pevnými body vědy a v jejichž rámci se daná věda rozvíjí. Jinými slovy, paradigma nastoluje problémy, které jsou následně v souladu s tímto základním pojetím řešeny a výsledky dále slouží k expanzi paradigmatu. Podle T. S. Kuhna, autora teorie paradigmat (1962), se tento typ výzkumu nazývá „normální vědou“ neboli „luštěním puzzle“ (147). Občas ovšem narazíme na fakt, který nemůže být vysvětlen v rámci teorie stávajícího paradigmatu. Tato pozorování se nazývají anomáliemi a postupně vedou ke krizi celého základního pojetí. Následně se paradigma buď upraví, nebo se musí úplně opustit. Dojde tak ke vzniku zcela nového a odlišného paradigmatu (tzv. paradigm shift).

Předpoklad o nevrátivosti fibrózy vyplýval z klinické zkušenosti v době, kdy se obvykle fibróza/cirhóza diagnostikovala až ve své nejpokročilejší formě. Detailní popisy cirhotických jater se většinou omezovaly na pitevní materiál, příkladem může být záznam Malloryho z roku 1914: „...cirrhosis is not a progressive chronic process, but an end-product“ (148). Na rozdíl od tradičního pojetí, kdy se cirhóza považovala za ireverzibilní stav, který může maximálně pomalu progredovat, ale nikoliv ustupovat, nedávné důkazy naznačují, že i pokročilá fibróza může ustoupit (149). Významnou a přelomovou se stala práce publikovaná v roce 1979 (Perez-Tamayo), která shrnula dosavadní nálezy a důkazy o reverzibilitě fibrózy a cirhózy, a to jak experimentální pokusy na zvířeti, tak humánní klinické kazuistiky (150).

V experimentálně navozené fibróze může ústup vyvolávajícího patologického činitele k regresi fibrózy (151). Také u nemocných může úspěšná léčba či odstranění základní choroby vést k spontánnímu zmenšení až vymizení fibrózy. Tento názor podporují klinicko-patologické zkušenosti u nemocných s jejunoileálním bypassesem (152), hemochromatózou (153), Wilsonovou chorobou (154), alkoholickou nemocí jater (155), chronickou hepatitidou C (156), chronickou hepatitidou B (157), sekundární biliární cirhózou (158), NASH (159), autoimunitní hepatitidou (160) a pravděpodobně také s chronickým polékovým či toxickým poškozením jater. Nejintenzivněji prostudovanou skupinou jsou pacienti s hepatitidou C, z nichž téměř polovina měla při úspěšné léčbě nějaký stupeň regrese fibrózy. Zatím se neví, zda je tento ústup spojen s dlouhodobými efekty – např. s nižším výskytem komplikací portální hypertenze, nebo dokonce s poklesem mortality.

Na rozdíl od reverzibility fibrózy jaterní tkáň je situace nejasná u rozvinuté cirhózy, protože její součástí jsou také změny vaskulární a nodulární regenerační. Abnormality v architektuře jater a v intrahepatální cirkulaci nejspíše zůstávají. I přes výrazné

funkční a strukturální zlepšení je kompletní ústup všech anatomických změn nepravděpodobný.

S regresi cirhózy nejspíše také souvisí klinicky i histopatologicky pozorovaný přechod cirhózy mikronodulární v cirhózu makronodulární. V této souvislosti studie popisují vznik tzv. **inkompletní septální fibrózy** jako možného následku regredující cirhózy. Předpokladem je odstranění vyvolávající příčiny. Histologické kontinuum by mohlo být následující: mikrononodulární cirhóza, makronodulární cirhóza a inkompletní septální fibróza (161). Inkompletní septální fibróza může být také jenom variantou makronodulární cirhózy. Otázka není dosud uzavřena.

Hlavním mechanismem poklesu nadměrného množství patologické ECM je kolagenolýza (fibrolýza). Fibrilární kolageny (I a III) jsou degradovány pomocí metaloproteináz (MMP-1, -8, -13). Zvýšenou aktivitu metaloproteináz umožní uvolnění inhibitorů (TIMP) z vazby, což je koncept, který podporují nálezy poklesu fibrózy při inhibici TIMP-1 v experimentu (162). Tím jsou přirozeně odblokovány metaloproteinázy a latentní proteolytická aktivita. Přetrvává-li aktivita onemocnění, přetrvávají vysoké hodnoty TIMP-1 a zhoršuje se možnost proteolýzy, protože kolagenní makromolekuly se mechanismem pevného překřížení vláken (tzv. crosslinking) postupně během měsíců stabilizují (163). Je pravděpodobné, že právě období pevné stabilizace kolagenních vláken je tím bodem na časové ose, kdy se fibróza postupně stává obtížně reverzibilní či přímo ireverzibilní. Enzymatickou úlohu při zpevnění kolagenní sítě mají tkáňové transglutaminázy, které jsou mj. zvýšeně tvořeny aktivovanými HSC (164).

Aktivnější role v degradaci fibrilární matrix ve fázi rezoluce fibrózy je připisována Kupfferovým buňkám (makrofágům). Studie zdůrazňují dvojí koncept aktivity perisinusoidálních makrofágů lokalizovaných v blízkosti fibrotických jizev (tzv. SAM – scar associated macrophages) (165). Jejich úloha v období aktivace HSC byla již zmíněna, ale nově se popisuje jejich role v degradaci ECM po ústupu vyvolávajícího poškození. Dochází k přeprogramování makrofágů a změně fenotypu, nebo existují odlišné buněčné podtypy aktivované za různých okolností a při změně okolního biologického prostředí? Hrají zde nějakou roli makrofágy jater odvozené z buněk kostní dřeně?

MMP-9, která je vytvářena v Kupfferových buňkách, je ale proteáza degradující bazální matrix (viz aktivace HSC a také regenerace jater). Má tudíž uplatnění ve fázi aktivace, kdy je žádoucí narušení normální původní matrix. Buď tedy makrofágy produkují další metaloproteázy, které by narušovaly fibrilární vlákna, nebo má MMP-9 širší spektrum účinku.

Přežití aktivovaných HSC je závislé na solubilních růstových faktorech, cytokinech a strukturálních informacích z okolní matrix. Významná z hlediska iniciace zániku aktivovaných HSC může být strukturální změna matrix a prostředí, ze kterého HSC přijímají signály (166). Makrofágy v období rezoluce napomáhají degradaci fibrilární ECM a změně této signalizace.

1.7.1 Apoptóza jaterních myofibroblastů

Procesu změny formy fibrózy nejspíše předchází apoptóza HSC, tzn. že se buňky odpovědné za nadbytečnou produkci ECM a cytokinů odstraní procesem naprogramované smrti (nejvýznamnější je následný pokles tvorby TIMP-1) (167, 168, 169). Podmínkou je odstranění vyvolávající choroby jater (abstinence, toxické poškození, léčba infekce apod). Apoptóza aktivovaných HSC je pravděpodobně automaticky

nastaveným mechanismem v játrech (tzv. default mechanism), který je blokován řadou solubilních faktorů během aktivní fáze poškození. Během aktivace jsou samy schopny vytvářet na svém povrchu tzv. death receptory (DR), tj. receptory, při jejichž aktivaci dochází ke spuštění jedné či více předem připravených intracelulárních apoptotických cest. Součástí těchto cest jsou kaskády proteáz (tzv. kaspázy). Výsledkem je dezintegrace buněčné DNA, rozpad buňky a likvidace zbytků okolními fagocytujícími elementy (170).

Jedním z těchto „smrticích“ receptorů je tzv. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptor, který se zvýšeně tvoří na povrchu HSC během aktivace. Prokázali jsme, že HSC se vlastní aktivací stávají senzitivnější na vnější proapoptotickou signalizaci (171). Kupfferovy buňky jsou prokazatelně jedním ze zdrojů ligandu TRAIL, což znamená, že makrofágy jsou schopné ve fázi regrese fibrózy likvidovat cestou indukce apoptózy buňky odpovědné za produkci fibrilární matrix – HSC (172).

NK-buňky jater jsou také pravděpodobným antifibrogenním regulátorem (173). Klidové HSC nereagují na proapoptotickou signalizaci vycházející z NK-buněk. Naopak aktivované myofibroblasty se stávají vnímavými na takovéto podněty. Mediátorem je pravděpodobně také ligand TRAIL.

Dalšími DR (apoptotické death receptory) v HSC jsou např. Fas a NGFR (nerve growth factor receptor).

Antifibrogenní vliv interleukinu-10 (IL-10) byl již uveden (viz chemotaxe).

Likvidace aktivovaných myofibroblastů (HSC) cestou apoptózy po odeznění vyvolávajícího poškození je prokázaným fyziologickým jevem. Nemá ale zcela zodpovězena otázka možnosti návratu aktivovaných HSC do klidového stavu *in vivo*, i když tento pochod byl pozorován v experimentu na tkáňové kultuře. Injekce aktivovaných HSC do Matrigelu (trojrozměrný substrát podobný bazální membráně užívaný ke kultivaci buněk) vedla ke snížení jejich aktivace (174).

1.7.2 Imunotolerance a fibróza jater

S tématem apoptózy souvisí také problematika imunotolerance a fibrózy jater. Narůstající množství informací svědčí o tom, že játra jsou imunomodulačním orgánem. Výsledky *in vitro* studií naznačují, že jedním z možných mechanismů by mohla být apoptóza T-buněk indukovaná jaterními hvězdíčovými buňkami (175). Aktivované myši HSC potlačily aktivitu lymfocytů v kultuře jejich odstraněním právě apoptózou (176).

Ke studiu vlivu HSC na imunotoleranci *in vivo* byla použita kotransplantace syngenních HSC s buňkami pankreatických Langerhansových ostrůvků. Aktivované hvězdíčkové buňky prodloužily přežití buněk tvořících inzulin, lokálně zabránily rejekci štetu a vedly k dlouhodobé euglykemii u diabetických myší. Následné histologické vyšetření ukázalo, že došlo k enkapsulaci inzulinových buněk vrstvami aktivovaných HSC. Množství CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů ve štetu bylo redukováno zvýšenou apoptózou (177).

Objev může mít řadu klinických důsledků. Kromě otevřené možnosti kotransplantace v experimentální diabetologii se otevírá otázka imunotolerance v játrech. Nález potvrzuje ve své podstatě fyziologický význam fibrózy jater při ochraně hepatocytů proti nadměrné imunitní reakci. Jestliže HSC takto ochraňují hepatocyty proti útoku imunoaktivních buněk, jaký vliv bude mít antifibrotická léčba navozená apoptózou hvězdíčkových buněk? Nedojde naopak ke zvýšené destrukci hepatocytů imunitními buňkami?

HSC tak mohou mít vliv na klinicky prokázanou imunitoleranci jaterního štěpu a přenos HSC může být významnou součástí izolované transplantace hepatocytů.

1.7.3 Progrese fibrózy jater

Rychlost progrese fibrózy u jednotlivého nemocného nelze s jistotou určit. Přesto lze zobecnit následující tvrzení:

- Fibróza k svému významnému rozvoji většinou vyžaduje řadu roků až dekád. Výjimkou jsou choroby, kdy fibrotizace jater postupuje rychleji, někdy již během měsíců. Patří sem: 1) mechanická obstrukce žlučových cest, včetně neonatálních biliárních atrezií; 2) infekce virem HCV po transplantaci jater vede u části nemocných k rychlé progresi s cholestatickými rysy; 3) koinfekce HIV/HCV, zejména není-li HIV infekce léčena; 4) těžká delta-hepatitida; 5) venookluzivní choroba; 6) některá toxická poškození léky.

Nezávislémi faktory rychlejší progrese fibrózy jsou konzumace alkoholu, starší věk v době infekce a mužské pohlaví (178).

- Podle studií s alkoholickou chorobou jater a hepatitidou C lze shrnout, že vážnost poškození a zánětu obvykle korelují s rychlostí progrese fibrózy. Nebyla ale zjištěna podobná korelace s genotypem hepatitidy C.
- Více než jeden typ poškození znamená synergické působení na vývoj fibrózy. Nález vyplývá ze studií s hepatitidou C a alkoholem, virovou infekcí HCV a HBV, HCV a HIV, vyšším obsahem železa a také s jaterní steatózou/steatohepatitidou (NASH). U některých chorob (alkohol, NASH, HCV) je prokázaným faktorem také vyšší BMI ($>28 \text{ kg/m}^2$).
- Přesný okamžik, kdy se fibróza stává ireverzibilní, není znám. Není korelace s žádným specifickým nálezem, ať v histologickém obraze, či v možné změně kompozice matrix. Za významné se považuje stadium zpevnění jizvy v období stabilizace překřížení kolagenových vláken (crosslinking). Reverzibilní mohou být i překvapivě velmi pokročilá stadia. Dokumentovaná reverzibilita zahrnuje alkoholickou nemoc jater, hepatitidu B, hepatitidu C, biliární obstrukci a další (citace jednotlivých klinických pozorování viz kapitola o reverzibilitě fibrózy). Nedávná studie u nemocných s chronickou hepatitidou B (HBeAg neg) pozorovala zlepšení fibrotického skóre (dle Ishakovy klasifikace) u 71 % nemocných po 5 letech podávání adefoviru dipivoxilu (179).

Stále máme málo klinických i patologických informací o rychlosti regrese jaterní fibrózy a jejím charakteru. V době vydání této publikace by měla již probíhat multicentrická studie REGRESS, která se na souboru úspěšně léčených nemocných s chronickou hepatitidou C snaží lépe definovat nemocné s různým stupněm ústupu fibrózy, včetně jeho vlivu na základní klinické a epidemiologické ukazatele (180).

- Předpokládá se významný vliv genetických faktorů hostitele. Identifikace různých polymorfizmů, které by mohly dobře předpovídat rizikovost, bude mít praktický význam v prevenci rychle progredující fibrózy. Lékařská doporučení budou moci být více orientována na jednotlivého nemocného.

1.8 Necirhotická portální fibróza

Synonyma: non-cirrhotic portal fibrosis (NCPF), idiopatická portální hypertenze (termín užívaný v Japonsku), hepatoportální skleróza (v USA).

Nemoc je charakterizována přítomností portální hypertenze při vyloučení cirhózy jater a extrahepatální obstrukce portálního řečiště. Klinicky je přítomna splenomegalie, mírná anémie a normální jaterní funkce. Nemocní trpí projevy komplikací portální hypertenze, zejména krvácením do trávicího traktu (85 %). Ikterus, encefalopatie a ascites jsou vzácné. Někteří nemocní vytvoří spontánní porto-systémové kolaterály. V histologii jater je přítomna zachovaná lobulární architektura, portální fibróza různého stupně, skleróza či vymizení drobných větví portální žíly a subkapsulární zjizvení jater s atrofií přilehlého parenchymu. Etiologie je nejasná, dochází k fibrotizaci Disseho prostoru („porto-venózní obliterace“), předpokládáme spoluúčast možného chemického poškození (např. arzén?), autoimunitních procesů či infekce (181).

Onemocnění sice není v Evropě příliš časté, přesto jsme měli možnost v posledním roce diagnostikovat čtyři nové pacienty.

1.9 Klinická diagnóza a hodnocení pokročilosti fibrózy

Diagnóza fibrózy a její kvantifikace jsou důležitými faktory v rozhodování při zahájení léčby chronických jaterních chorob. Historicky byly pokročilá fibróza a cirhóza klinicky diagnostikovány při nálezů tuhých, zvětšených a hrbolatých jater palpací. Jedná se ovšem o relativně málo senzitivní metodu, která v počátečních stádiích selhává. Zlepšení přinesla technika jaterní biopsie, která se stala v posledních šedesáti letech zlatým standardem. Objevily se také nové zobrazovací metody a neinvazivní testy.

1.9.1 Biopsie jater

Tradičně se diagnóza fibrózy opírá o biopsii jater. Rozhodnutí o provedení jaterní biopsie není jednoduché ani pro lékaře, ani pro pacienta. Navíc některé choroby vyžadují pravidelné monitorace progresu choroby nebo úspěšnosti léčby a mnoho nemocných s opakovanými biopsiemi nesouhlasí. Výkon se na řadě pracovišť provádí pouze za hospitalizace, což pro nemocného (a pojišťovny) znamená další nepříjemnost. Výkon není bez rizika, mortalita se udává mezi 0,1–1 promile (182, 183). Jestliže až 40 % pacientů uvádí bolest po výkonu, pak je třeba z pohledu pacienta považovat biopsii za velmi nepříjemný zákrok (184). Také řada lékařů provádí biopsii s obavami.

Incidence komplikací souvisí podle většiny studií s přítomností relativních kontraindikací pacienta a zkušeností lékaře, tj. počtem provedených biopsií (185). Četnost komplikací u lékaře se zkušeností pod 20 biopsií je okolo 3,2 % v porovnání s 1,1 % komplikací u lékaře se zkušeností nad 100 výkonů (186).

Přes tato omezení zůstává biopsie jater v klinické praxi stále základním vyšetřením v diagnostice jaterních lézí a stupně fibrotizace (staging).

Velkým omezením je velikost bioptického vzorku, množství odebrané tkáně v jedné biopsii odpovídá přibližně 1:50 000 jater (188). Důsledkem je malá reprezen-

tivnost vzorku (sampling error). Výtěžnost necílené biopsie jater k stagingu fibrózy a diagnostice cirhózy byla porovnávána s nálezy při pitvě nebo laparoskopii. Tyto studie prokázaly, že cirhóza jater není diagnostikována jednou necílenou jaterní biopsií v 10–30 % případů (189, 190, 191, 192). Obvyklou chybou je nižší staging a podhodnocení je výraznější u nemocných s makronodulární cirhózou. Cirhóza se nevyvíjí v játrech homogenně a najednou, ale naopak. Jak velikost biopsie, tak množství odebraných biopsií mají vliv na přesnost diagnózy (193). Čím menší vzorek, tím mírnější chronická hepatitida C (194). Za žádoucí se považoval vzorek s alespoň 15 mm délky, který obsahoval minimálně 5 portálních polí (195). Tento koncept se ale nedávno změnil, za minimální délku bioptického vzorku je třeba považovat 20–25 mm s alespoň 11 portálními poli (196). Bohužel pouze 5,3 % terapeutických studií u hepatitidy B a C (11 z 207) uvedlo přesně délku nebo počet portálních polí v biopsii (197). Je zajímavé, že zkušenost patologa může mít větší vliv na interpersonální shodu v popisu nálezu než délka bioptického vzorku (198).

Při odběru tří vzorků místo jednoho stoupla přesnost diagnózy z 80 % na 100 % (199). Odeberou-li se biopsie navíc z odlišných míst, například z obou laloků jater, tak odlišnost nálezů stoupá ještě více – např. diagnóza cirhózy byla provedena v 14,5 % případů pouze z jednoho laloku, a ne z druhého (200).

Důležitý je také typ použité jehly. U cirhotiků je nejspíše vhodnější řezací typ jehly (tru-cut systém) oproti klasické Menghiniho – diagnóza cirhózy stoupla z 65 % na 89 % při použití reprezentativnějšího tru-cut vzorku (201).

Kromě nereprezentativnosti vzorku je jaterní biopsie zatížena interpretační chybou. Významné je dodržování přesných diagnostických kritérií v posuzování biopsie. Řada center přešla k standardizovanému hodnocení fibrózy (Knödel, modifikace Ishak, Desmet, Scheuer, Metavir F0-F4), což nepochybně zlepšilo přesnost a reprodukovatelnost nálezu. Zlepšila se také intra- a interpersonální variabilita u stagingu, nikoliv ale u hodnocení zánětlivého skóre (202).

Histologické hodnocení fibrózy je ale přesto založeno na chybných předpokladech:

1. je totiž nevhodné charakterizovat kontinuální proměnnou, jakou množství fibrotické tkáně nepochybně je, pomocí kategorických hodnot (staging fibrózy).
2. Navíc histologický staging předpokládá lineární vzestup v tíži fibrotického poškození mezi jednotlivými stupni, ale stupeň 4 nezbytně neznamená, že je přitomno 2x více fibrózy než u stupně 2. Např. v hodnocení Metavir obsahuje F4 asi 5–20x více vaziva než stupeň F2. Různé kontinuální proměnné mohou proto být vhodnější.

K zhodnocení fibrotického skóre byla použita i různá počítačová zpracování vzorků (automated image analysis), korelace s patologem zatím nejsou přesvědčivé, nicméně jsou nadějně (203, 204). V klinické praxi se většinou velké bioptické vzorky nezískávají, což znamená, že nereprezentativnost vzorku je nejspíše nejvýraznějším jednotlivým omezením v hodnocení fibrózy jater pomocí biopsie. Automatické zpracování bioptického materiálu, i když s sebou přináší přinejmenším teoretickou výhodu, bohužel stále pracuje s bioptickým materiálem o různé velikosti. Mohou ale vést ke zlepšení standardizace (205).

Hodnocení regrese fibrózy biopticky naráží na další metodologický problém. Doposud neexistuje prospektivní validační studie hodnotící biopticky regresi fibrózy namísto progresu.

Jaterní biopsie představuje tedy stále zlatý standard, byť s omezeními.

1.9.2 Imunohistochemické studie

Imunohistochemické studie hodnotí stupeň pokročilosti fibrózy pomocí imunohistochemické detekce parenchymatozních změn. Změny v morfologii jaterních hvězdčkových buněk jsou markerem nastupující fibrotizace či odpovědi na léčbu. Aktivace HSC je provázena ztrátou tukových kapek s retinoidy a expresí řady proteinů (alfa-SMA, vimentin, desmin, nestin atd) (206). Imunohistochemické barvení těchto proteinů bylo použito v řadě studií, a to nejenom experimentálních. Úspěšné užití markerů HSC v klinických studiích bylo potvrzeno při monitoraci antifibrotického efektu interferonu u chronické hepatitidy C a lamivudinu u HBV (207, 208). Při léčbě byl pozorován ústup původně velkého množství aktivovaných HSC v souladu s ústupem fibrózy jater a zánětlivým skóre.

Dalšími imunohistochemickými markery fibrotizace parenchymu jsou TGF-beta (hlavní profibrogenní cytokin v játrech) a CTGF (connective tissue growth factor, regulátor TGF-beta) (209, 210, 211). Alternativními imunohistochemickými ukazateli jsou různé sloučeniny, které jsou součástí ECM v různých stádiích vývoje jizvy (tenascin, vitronektin) (212).

1.9.3 Zobrazovací metody

Zobrazovací vyšetření jsou u fibrózy jater zajímavá ze dvou důvodů: jsou neinvazivní a k zachytu strukturálních změn jsou vhodnější než sérologické testy.

Rutinním vyšetřením u hepatopatií je *ultrasonografie jater* (UZ). Kritérií, podle kterých je možné diagnostikovat cirhózu, je celá řada, studie obvykle používaly větší množství sonografických znaků (213), včetně dopplerovského vyšetření (214).

Mezi dlouhodobě sledované sonografické znaky cirhózy patří např. nerovnosti povrchu a okraje jater (215), zhrubnutí až nodularita parenchymu (216), relativní zvětšení levého laloku a atrofie segmentu IV (217), nerovnost a komprese jaterních žil, řada indexů popisujících zvětšení lobus caudatus (segment I) (218), přítomnost žilních kolaterál (včetně rekanalizace vena umbilicalis) (219, 220), dilatace hlavního kmene portální žíly (> 14 mm, senzitivita 42 %) (221), dilatace vena lienalis, vena mesenterica superior, změny v závislosti na respiraci (222) a další.

Klasifikační systém tzv. periportální fibrózy byl navržen pro nemocné se schistosomiázou, kde je fibróza jater dominantní. Mohl by mít význam při screeningových vyšetřeních.

Z dopplerovských znaků existující studie popisují např. změny signálu jaterních žil (Bolondiho klasifikace: mono-, bi-, trifázická křivka) (223, 224), portální žíly (maximální a průměrná rychlost toku V_{max} a V_{mean} v cm/s, průměrný průtok v ml/min, kongestivní index (Moriyasu, plocha průřezu/maximální rychlost toku V_{max}) (225), změny pulsatility, změny vzniklé postprandiálně či v závislosti na respiraci a celá řada dalších) (226), slezinné žíly (znaky obdobné jako u portální žíly), a. hepatica (poměry maximální, průměrné a minimální rychlosti toku, jako např. rezistivní index RI (227), pulsatilní index PI (228), a. lienalis a a. mesenterica superior. Ušetřena různých měření v souvislosti s diagnostikou cirhózy jater nebyla ani dolní dutá žíla či stěna žlučníku.

Zjišťovala se využitelnost různých poměrů parametrů získaných z a. hepatica a v. portae. Příkladem je tzv. perfuzní index (Walsh) (229), cirkulační index (Sugimoto) (230),

index portální hypertenze (Piscaglia 2001 (231), korekce 2003 (232)), arterio-portální poměr (Hirata) (233) a jaterní vaskulární index (Iwao) (234).

Význam uvedených znaků v diagnostice cirhózy jater je sporný či alespoň nejasný. Největší diagnostickou přesnost měla (např. z 11 sledovaných znaků) nerovnost povrchu jater, délka sleziny a velikost jater (235). Klinickým problémem je nestandardizace těchto kritérií a možné je i opomíjení sledování řady z nich při běžném rutinním vyšetřování sonografistou, což při vyšetření zdůrazňuje význam rigidního, standardního postupu podle schématu (236). Úskalím je velká variace nálezů mezi jednotlivými vyšetřujícími a zároveň mezi jednotlivými vyšetřeními u jednoho vyšetřujícího sonografisty (inter- a intraobserver variation). Předpokládáme, že výsledky jsou také významně přesnější, vyšetřuje-li cirhotická játra dedikovaný specialista v ultrasonografii jater. Senzitivita a specificita sonografie (při sledování více znaků) se pohybuje mezi 70–90 % v diagnostice fibrózy jater, přesnější výsledky jsou u dekompenzované cirhózy.

Řadu pacientů s dekompenzovanou cirhózou lze ovšem diagnostikovat jednoduše fyzikálním vyšetřením (např. hrbolatá tuhá játra palpací), tj. bez nutnosti sonografie. Cílovou skupinou sonografie by tedy měla být časná stadia fibrózy/cirhózy.

Význam dopplerovského vyšetření v diagnostice fibrózy u skupiny nemocných s hepatitidou C byl výrazně zpochybněn u recentní dobře definované prospektivní studie (jedinými validními ukazateli byla délka sleziny – což ostatně není ani dopplerovská hodnota – a možná také odchylky od obvyklé trifázické křivky pulzace jaterních žil) (237). Že sonograficky změřená velikost sleziny odpovídá skutečné velikosti, je ovšem známo od r. 1979 (238).

Sonografie diagnostikuje řadu cirhotických pacientů tam, kde diagnóza cirhózy nebyla uzavřena provedenou biopsií. Lze tedy argumentovat, že US má komplementární hodnotu, tj. že dobře provedené sonografické vyšetření může odhalit nemocné s cirhózou tam, kde je bioptický nález nejednoznačný nebo je v rozporu s celkovým klinickým obrazem.

Stranou tématu této kapitoly zůstává detekce hepatocelulárního karcinomu u cirhotiků.

Kontrastní ultrasonografie jater – contrast enhanced ultrasound (CEUS) – je nový směr sonografického vyšetření jater (239). Kontrastní látky se používaly již dříve, mezi zástupce první generace patří např. Levovist (Schering AG, Berlín, Německo). Změnu přinesla až druhá generace těchto látek, které jsou stabilnější v cévním řečišti, a tudíž umožní pohodlnější vyšetření. V současné době je nejužívanější kontrastní látkou v Evropě SonoVue (Bracco, Milán, Itálie) (240). Chemicky se obě generace echokontrastních látek liší – zatímco Levovist jsou vzduchové bublinky stabilizované obalem z palmitové kyseliny, SonoVue obsahuje plyn hexafluorid síry ve fosfolipidové slupce. Jejich kompartment je omezen na cirkulující krev a jsou přitom dostatečně malé, takže prostupují plicním řečištěm. Tyto bublinky se rozkmitají pomocí ultrazvukového signálu vysílaného sondou do jater, prasknou a tím zvýrazní signál. U první generace kontrastní látky byla téměř celá podaná dávka zničena sonografickým signálem o vysoké intenzitě již při prvním průchodu játry, vyšetření proto bylo nutné nahrávat a záznam následně hodnotit. Vyšetření nebylo proto vhodné např. pro intervenční zákroky. Výhodou bylo, že techniku šlo použít na každém přístroji vybaveném barevným dopplerovským signálem. Druhá generace (SonoVue) vydrží v řečišti mnohem déle, počasí je až 6 hodin. Je nutné ovšem použít přístroj se speciální zobrazova-

cí a pulzní technikou, výsledkem je zvýraznění změn odstínů šedé barvy (B-mode). Nejedná se tedy o zesílení dopplerovského signálu jako u první generace. Zlepšení zobrazení cévního řečiště a prokrvení parenchymu jater lze docílit signálem o nízké intenzitě (tzv. low mechanical index), který je šetrnější vůči kontrastní látce. Lze tak odlišit 3 fáze průtoku kontrastní látky játry – arteriální, časnou a pozdní portální. Hlavní oblastí aplikace CEUS jsou ložiskové léze jater, diagnostických prací u cirhotických nemocných je zatím málo.

Studie, kdy byly měřeny jednak intervaly od intravenózní aplikace kontrastní látky po její detekci v jaterních žilách (HVTT – hepatic vein transit time, arrival time) a jednak doba od zachycení signálu dopplerovským vyšetřením po jeho maximální intenzitu (peak enhancement time) odhalily rozdíly mezi nemocnými s cirhózou a necirhotiky. Čas příchodu látky od podání do střední jaterní žíly byl u cirhotiků kratší oproti ostatním chronickým jaterním lézím a normálním kontrolám (všichni cirhotici <17 sekund). Příčinou byly nejspíše intrahepatální cévní zkraty přítomné u cirhotiků, dále arterIALIZACE jaterních sinusoid a v menší míře i zkraty v plicích a trávicím traktu. Pokles času statisticky nesignifikantně koreloval i se stupněm dekompenzace podle Childova-Pughova skóre (CPS-C oproti CPS-A) (241).

Naše vlastní zkušenosti s použitím sonokontrastních látek (SonoVue) jsou převážně v podání u ložiskových lézí jater, kde CEUS představuje nepochybné zlepšení diagnostiky. Standardní klinické využití při diagnostice fibrózy/cirhózy je v nejbližší době méně pravděpodobné.

Perspektivní metodou vyšetřování fibrózy je *tranzientní elastografie* – měření elasticity jaterní tkáně (transient elastography principle, LSM – liver stiffness measurement). Sonografická sonda je napojena na vibrátor. Ten vysílá signály s nízkou amplitudou směrem do jaterní tkáně. Vibrační vlny prostupují tkání, rychlost šíření závisí na charakteru (tuhosti) tkáně. Současně vysílající pulzní echosignál měří rychlost propagace vibrace. Čím tužší tkáň, tím rychleji vlny prostupují. Výsledky jsou vyjádřeny v kilopaselech (kPa), které mohou být extrapolovány do fibrotického skóre. Komerčními přístroji jsou např. Fibroscan® (Echosens, Francie) nebo SonoElastography (Hitachi Medical Systems).

Vyšetření přístrojem Fibroscan® je v praxi velmi jednoduché, trvá cca 5 minut, sonografista po standardním UZ vyšetření provede 10 měření, která přístroj okamžitě vyhodnotí a vypočítá průměr a standardní odchylku. Vyšetření je obtížné u obézních a ascitických pacientů. Metoda čeká na klinické zhodnocení, ale již se objevují první využitelné závěry. Na velkém souboru koreluje tuhost jaterní tkáně s klinickými a laboratorními parametry a nyní se zjišťují možné diskriminační hodnoty pro přítomnost cirhózy a řady jejích komplikací – jícnových varixů, ascitu, hepatocelulárního karcinomu apod (242). Fibroscan dosahoval přesnějších výsledků u cirhotických nemocných (Metavir F4) než u pacientů s nižším stupněm fibrotizace tkáně. Lepší korelace byla také tam, kde byl k dispozici větší biotický vzorek (nižší sampling error) (243, 244). Nemocní s hepatitidou C a s minimální fibrózou v histologii mohli být ušetřeni biopsie pomocí Fibroscanu (26 z 26). A navíc – pacienti vhodní k antivirové léčbě, tj. s fibrotickým skóre F2 a vyšším, by také byli identifikovatelní pouze pomocí Fibroscanu (14 ze 14) bez nutnosti jaterní biopsie (245).

Fibroscan nenahradí primární biopsii, byl vyvinut jako metoda neinvazivního stagingu jaterní choroby. Není schopen určit příčinu choroby ani její aktivitu (grading). Nicméně může být schopen nahradit biopsii při hodnocení progresu jaterní léze.

Vyšetřovaný vzorek jaterní tkáně je asi 100x větší než velikost jaterní biopsie. Jako s každým novým diagnostickým testem bude nutné metodu zhodnotit, určit variabilitu mezi vyšetřujícími a porovnat vůči jiným histologickým skóre (např. podle Ishaka) na celém klinickém spektru pacientů. Výsledky jsou také hodnoceny oproti nedostatečnému zlatému standardu – jaterní biopsii. Většina studií byla zatím také provedena pouze na nemocných s hepatitidou C. Metoda je pacienty dobře snášena, je neinvazivní, nebolestivá a teoreticky by měla být použitelná u všech jaterních chorob. Možná nejlepší využití metody tranzientní elastografie bude v longitudinální monitoraci chorob po bazální biopsii. Výsledky jsou také vyjádřovány v kontinuální proměnné, a mohou tudíž lépe popisovat nárůst nebo úbytek fibrotické tkáně.

Realtime sonoelastografie (v přístrojích firmy Hitachi) poskytuje barevný dvourozměrný obraz vyšetřované tkáně. Oblasti s odlišnou tuhostí jsou barevně odlišeny. Význam u jaterní cirhózy není zatím znám, předchozí studie se především zaměřily na ložiskové léze (např. karcinom prsu). Techniku lze také použít při endosonografickém vyšetření tkání (např. při odlišení zánětlivého pseudotumoru pankreatu od karcinomu). Příbuznou technikou je MR-elastografie (MRE), která využívá přístroje pro magnetickou rezonanci (246).

Zkušenosti našeho pracoviště s oběma technikami (Fibroscan a Sonoelastografie firmy Hitachi) hovoří zatím spíše ve prospěch první metody, prakticky u všech pacientů s chronickým zánětem jater je již součástí běžného rutinního vyšetření také určení hodnoty elasticity v kPa.

Dalšími používanými vyšetřovacími metodami jsou *výpočetní tomografie (CT)*, *nukleární magnetická rezonance (NMR)*, *analýza textury* a *MR spektroskopie*. Vyšetření CT (výpočetní tomografie) a NMR (nukleární magnetická rezonance) se spíše soustřeďuje na diagnostiku ložiskových lézí (časné detekce hepatocelulárního karcinomu oproti dysplastickým a regenerativním uzlům v terénu pokročilých cirhotických jater) než na odhalení časných fází cirhózy samotné. V diagnostice fibrózy přinášejí zhruba podobnou přesnost jako sonografie jater. Mezi jevy, které byly hodnoceny při detekci časně cirhózy, patří poměr lobus caudatus k pravému laloku transversálně (C/RL ratio, původní popis pro US a CT Harbin, 1980 (247), zvětšení hilového periportálního prostoru v důsledku atrofie pravého laloku a mediálního segmentu levého laloku, zvětšení oblasti okolí žlučníku („gallbladder fossa sign“) a změny povrchu jater v blízkosti pravé ledviny („right posterior hepatic notch sign“). Nálezy jsou subjektivní, existují velké diagnostické přesahy mezi jednotlivými stupni pokročilosti cirhózy a normálními nálezy. Při pokročilé cirhóze pak přistupují obvyklé nálezy – nodularita povrchu, regenerační uzly v parenchymu, komprese jaterních žil, ascites, splenomegalie, kolaterály apod. (248).

MR-kontrastní látky SPIO (superparamagnetický oxid železa) a gadolinium po intravenózním podání zvýrazňují retikulace v cirhotických játrech. SPIO podané intravenózně se vychytává v játrech, zkracuje T2 časy a redukuje intenzitu signálu. Samotné T2 vážené MR-studie s gadoliniem nepřinášejí žádnou novou diagnostickou hodnotu v hodnocení cirhotických jater (249). Nicméně obě komerční MR-kontrastní látky použité v kombinaci měly více jak 90% senzitivitu a specificitu u F3 a F4 fibróz (250).

K odlišení pacientů s jaterní cirhózou byla také s nadějnými výsledky vyzkoušena magnetická rezonance s ultrakrátkou pulsní frekvencí (UTE – ultrashort echo time). Dekompenzovaní pacienti s pokročilou cirhózou (Child-Pugh C) se významně lišili od kompenzovaných nemocných (CPS A). Vysvětlením může být, že protony vázané

na molekuly vody v kolagenu mají kratší T2 relaxační časy než protony ve vodě vázané na bílkoviny (251).

Tzv. difuzně vážené MR-zobrazování je další možnou metodikou. Technika se doposud užívala hlavně v zobrazování změn v mozku, ale ve fibrotických játrech může odhalit drobné změny v distribuci vody (252).

Detekce změn průtoku pomocí MR (perfuzní MR). Depozice kolagenu vede ke změnám v poměrech v průtoku v portálním a arteriálním systému. Změny perfuze by mohly být zachytitelné novými MR-technikami (253).

V souvislosti s cirhózou jater studuje magnetická rezonance také množství železa v tkáni.

Je také možné následně počítačově pracovat s obrazy jaterní tkáně, získaných pomocí histologie nebo různých zobrazovacích technik (nukleární magnetické rezonance, ultrasonografie jater apod.). Příkladem technologie může být hodnocení pomocí tzv. **analýzy textury** (texture analysis) (254). Texturu obrazu vytváří vzhled, struktura a uspořádání částí objektu v obraze. Obrazy, které se využívají k diagnostickým účelům, jsou digitálně zpracované. Mohou být dvojrozměrné, tvořené z drobných pravoúhlých obrazů (pixelů), nebo trojrozměrné, vytvářené analogickými bloky (voxely). V lékařství se většinou používají obrazy dvojrozměrné. Každý pixel (event. voxel) je charakterizován sadou souřadnic a stupněm šedi. Analýza textury je v principu technika hodnotící pozici a intenzitu signálu, tedy distribuci odstínů šedé mezi body v dané oblasti našeho zájmu. Lze tak matematicky charakterizovat strukturu hodnoceného objektu (např. jaterní tkáně). Metod, které hodnotí vzájemné vztahy mezi jednotlivými body, je celá řada a jedná se o komplikovaná matematická, často statistická, vyhodnocení (255). Zpracování je nutně počítačové (např. MAZDA software), zatím bez většího klinického využití (256, 257). Zpracovávané a vyhodnocované oblasti parenchymu mohou mít např. rozměry 3×3 cm, jsou tedy větší než biotický vzorek. Předpokládáme časnější schopnost zachytu těch změn tkáně, které by byly zatím nedetekovatelné lidským okem. Odlišnosti by měly být zvláště v počátečních stádiích fibrózy. Technika je závislá na sofistikované technologii. Můžeme si představit v budoucnosti softwarový doplněk v sonografických nebo MR-přístrojích, který bude okamžitě vyhodnocovat „index fibrózy“ z obrazů jaterního parenchymu během rutinního vyšetření.

Experimentálním nástrojem k zhodnocení stupně fibrózy je fosforová magnetická spektroskopie jater (*in vivo* **31P MRS**), která pomocí MR-spekter sloučenin fosforu neinvazivně zachycuje změny parenchymu a odliší cirhotická játra od precirhotických stadií. Poměr fosfomonoesterů a fosfodiesterů (PME/PDE ratio) je indexem aktivity buněčných membrán a koreluje se stupněm poškození jaterní tkáně vyjádřené Childovým-Pughovým skórem. Další možností může být protonová magnetická spektroskopie jater (**1H MRS**), která identifikuje řadu metabolitů, jejichž koncentrace a složení se mění u jaterní steatózy a fibrózy. Výhledově může být užitečná kombinace difuzně vážené MR a MRS.

Vlastní zkušenosti s použitím metody analýzy textury jater a MR spektroskopie na našem souboru jsou pozitivní, nevýhodou je komplikované zpracování dat (258).

1.9.4 Funkční jaterní testy

Předchozí přístupy k detekci jaterní fibrózy zahrnovaly i *jaterní testy zaměřené na celkovou funkci jater*. Některé jsou vhodné převážně k detekci změn perfuze jater

(indocyaninová zeleň, sorbitol, galaktózová clearance), jiné na celkovou metabolickou kapacitu jater (^{13}C galaktózový dechový test, ^{13}C aminopyrinový dechový test). V nedávné studii byl ještě testován ^{13}C kofeinový test (259).

Test MEGX detekuje schopnost jater metabolizovat lidokain a je závislý na aktivitě jaterního cytochromu P 450 3A4. Měl senzitivitu a specifickou okolo 80 % v odlišení chronické hepatitidy od cirhózy (260).

Tyto testy se dnes v diagnóze fibrózy/cirhózy jater již nevyužívají. Důvodem je jejich nízká senzitivita k časně nebo středně pokročilé fibróze.

Pokud jde o *ostatní zobrazovací metody*, na hranicích současného vědeckého poznání se pohybuje tzv. nanoimaging, tj. využití nanočástic v přímé detekci a kvantifikaci fibrózy a zánětlivého infiltrátu v játrech (261). Technologie obecně umožňují použití fluorescentních polovodičových nanokrystalů (tzv. quantum dots nebo qdots) v biologii. U nové generace qdots předpokládáme široký rozsah využití, od studia procesů na úrovni jedné molekuly přes schopnost cílení na jednotlivé (např. nádorové) buňky až po celotělovou diagnostiku. Je pravděpodobné i jejich využití v diagnostice jaterních poruch (262).

1.9.5 Sérologická vyšetření

Sérologické testy jsou méně invazivní než biopsie, analýzu lze zautomatizovat a kvalitu testu ověřovat a standardizovat. Ideální marker jaterní fibrózy by měl splňovat následující kritéria:

1. specifitu pro játra,
2. hladiny neovlivněné poruchou jaterních, ledvinových a retikuloendotelových funkcí,
3. měl by měřit stage fibrózy, aktivitu ukládání ECM, aktivitu degradace ECM,
4. by měl být jednoduchý a levný.

O významné potřebě najít vhodný marker svědčí nárůst publikací v posledních letech.

Markery lze rozdělit na dvě skupiny – „nepřímé“ – ukazatele poruchy jaterních funkcí, ale nereflektující metabolismus ECM, a „přímé“, které odrážejí produkty metabolismu ECM (263). Význam testů by měl být v zlepšené neinvazivní diagnostice fibrózy, jejím stagingu, monitoraci progresu choroby a efektu léčby.

Řada studií trpí bohužel metodologickými omezeními, tj. jsou retrospektivní, nejsou uvedeny údaje jaterní biopsie (velikost vzorku, počet portálních polí, typ jehly, počet vpichů, lokalizace vpichu atd), často také byli zařazeni nemocní s klinicky jasnou cirhózou, kde testy mají omezenou hodnotu apod.

Nepřímé markery fibrózy

Byla vyzkoušena řada testů, např. poměr AST/ALT, množství trombocytů, protrombinový čas (264, 265, 266, 267) atd. Užitečným ukazatelem se může stát tzv. **PGA-index** – kombinace protrombinového času, gamaglutamyltransferázy (GMT) a apolipoproteinu A1 (268). PGA-index byl později doplněn o alfa-2-makroglobulin (tzv. **PGAA-index**) (269). Přesto se v klinické praxi příliš nezavedly.

Etiologie cirhózy ovlivnila výtěžnost a přesnost těchto testů – např. AST/ALT poměr měl diagnostickou přesnost 79 % u nemocných s virovou hepatitidou, ale pouze 65 % u alkoholické choroby jater. Indexy PGA a PGAA byly naopak přesnější u alkoholické choroby, méně přesné u virového původu (270). Hodnocení samotných

hodnot AST a ALT nedopadlo nejlépe a nejsou klinicky užitečné v odpovědi na danou otázku (tj. přítomnost významné fibrózy či cirhózy).

O trochu jiná je situace v poměru AST/ALT. Relativní nárůst AST je nejspíše způsoben nižší eliminací AST jaterními sinusoidálními buňkami a mitochondriální dysfunkcí. Studie potvrdily přímou úměru mezi poměrem AST/ALT a stupněm jaterní fibrózy. Poměr > 1 je velmi pravděpodobný pro tuto diagnózu (271), což bylo potvrzeno pro virovou etiologii a NASH. Výsledky a tím hodnocení jsou ale narušeny abúzem alkoholu. Hodnoty poměru AST/ALT > 1 měly senzitivitu okolo 78 % a specifitu 97 %. Diagnostickou přesnost bylo možné zvýšit kombinací uvedeného poměru s hodnotou trombocytů ($< 130 \times 10^9/L$) s pozitivní předpovědní hodnotou 97 % a negativní 86 %. Dále progresivní zvyšování poměru AST/ALT bylo v souladu s vzestupem funkčních testů – Childovým-Pughovým skóre a testem MELD. Korelace byla nalezena i v souladu s progresí lidokainového testu MEGX.

Dalším užitečným ukazatelem může být tzv. **FibroTest®** (BioPredictive) skupiny MULTIVIRC (Paříž) (272), souhrn pěti markerů (alfa-2-makroglobulin, haptoglobin, apolipoprotein A1, GMT a celkový bilirubin). Celková senzitivita a specifita FibroTestu k odhalení stupně fibrózy METAVIR F2 byla 75 % a 85 %. Test umožnil rozčlenit nemocné do 3 skupin, z nichž prostřední byla nerozhodná vzhledem k diagnostice fibrózy, a zde bylo nutné provést další vyšetření, tj. biopsii jater. Tento invazivní výkon ale bylo možné vynechat u obou krajních skupin (mírní a výrazně pokročilí) – celkem u 46 % nemocných. Nemocní s METAVIR skóre F2-F4 (fibróza vysoce pravděpodobná) byli pomocí FibroTestu odhaleni s pozitivní předpovědní hodnotou nad 90 % a negativní 100 %. Význam FibroTestu není ale zatím přesně stanoven. Byl využit i v zhodnocení výsledků velké studie s pacienty ($n = 352$) s hepatitidou C, kteří byli léčeni kombinovanou antivirovou léčbou (273, 274). Jeho modifikací je tzv. **ActiTest**, který by měl hodnotit i zánětlivou aktivitu. Zde je navíc ve výpočtu zahrnuta hodnota ALT. Výsledky dalších hodnocení FibroTestu byly pro diagnostiku pokročilé fibrózy dobré, i když nikoliv tak přesné jako v původní práci. Actitest byl mírně přesnější, a to zvláště u nemocných, kde byla odebrána biopsie delší než 15 mm nebo bylo-li ve vzorku 6 a více portálních polí, což svědčí pro fakt, že tyto biochemické nálezy odrážejí změny histologické. Navíc u některých nemocných došlo v důsledku podávané léčby k poklesu Knödellova histopatologického skóre v biopsii, tedy k ústupu fibrózy, a to někdy i více jak o jeden stupeň. Hodnoty FibroTestu zde také poklesly, což znamená, že biochemické markery by bylo možné s úspěchem použít k monitoraci antivirové léčby i v budoucnu.

Vybrané parametry Fibrotestu mají svá omezení. Falešně pozitivní výsledky mohou být při zvýšené hodnotě bilirubinu nebo snížení haptoglobulinu, např. při hemolýze u léčby ribavirinem, a podobně u hyperbilirubinemií typu Gilbertovy choroby nebo cholestatických stavů. Akutní zánět může ovlivnit hodnoty alfa-2-makroglobulinu a haptoglobulinu.

Vzorke k výpočtu FibroTestu i AktiTestu nebyly zveřejněny. Měření a kalkulace nutné k FibroTestu jsou ale komerčně dostupné (BioPredictive, Francie). Jedná se o nejslibnější nedávno vyvinuté neinvazivní skóre k hodnocení fibrózy jater. Celkem často se nyní používá ve Francii. V roce 2004 bylo množství provedených FibroTestů ve Francii u chronické hepatitidy C 3× vyšší ($n = 25\,000$) než obvyklé množství jaterních biopsií v této diagnostické skupině ($n = 8000$) (275). Před jeho celkovým doporučením je ale přinejmenším nutné ještě externí ověření s většími biotickými vzorky.

Jiným ukazatelem fibrózy je tzv. Index fibrózy (**Fornsův index**) barcelonské skupiny, který kombinuje věk nemocného, počet trombocytů, GMT a cholesterol (276). Skupina vytvořila následující vzorec:

$$7,811 - 3,131 \times \ln(\text{trombocyty}) + 0,781 \times \ln(\text{GMT}) + 3,467 \times \ln(\text{věk}) - 0,014 \times \text{cholesterol}^*$$

Dvě hraniční hodnoty pro přítomnost či absenci fibrózy byly zvoleny: < 4,2 (absen- ce fibrózy, senzitivita 94 %, specifická 51 %) a > 6,9 (přítomnost fibrózy, senzitivita 30 %, specifická 95 %). Test byl užitečný k vyloučení nemocných s minimální fibró- zou, ale výsledky u nemocných s pokročilou fibrózou byly o něco horší. Poněkud kon- troverzní je zařazení cholesterolu z důvodu možného ovlivnění častými poruchami metabolismu tuků v populaci.

APRI (AST to platelet ratio index), poměr AST k destičkám (277) je jednoduchý a snadno dostupný test.

$$\text{APRI} = \text{AST} \times 100 / \text{trombocyty}^{**}$$

Autoři (Ann Arbor, Michigan,) opět vyčlenili horní a dolní mezní hodnoty (APRI < 0,50 pro absenci fibrózy, APRI > 1,50 pro výraznější fibrózu), následné pozitivní (PPV) a negativní předpovědní hodnoty (NPV) u nemocných bez a s významnou fibrózou se pohybovaly mezi 61–88 %. Celkem u 51% nemocných mohlo být přes- ně zjištěno, zda mají nebo nemají fibrózu. Další diskriminační hodnoty určili pro jaterní cirhózu (APRI < 1,00 pro absenci cirhózy, APRI > 2,00 pro přítomnost cirhó- zy). Takto mohlo být klasifikováno 81 % pacientů (zda mají nebo nemají přítomnou cirhózu), PPV a NPV mezi 38–98 %. Test je atraktivní svojí jednoduchostí a tak jako ostatní testy vyžaduje nezávislá a četná prověření. Každý si jej může vypočítat u lůžka nemocného a tím může být užitečný při stratifikaci dalších diagnostických postupů.

Skupina ze Sydney publikovala na základě multivariantní logistické regresní ana- lyzy 35 dat u nemocných hepatitidou C index pravděpodobnosti fibrózy (**fibrosis pro- bability index** – FPI), kde kombinuje věk, AST, cholesterol, inzulinovou rezistenci a anamnézu abúzu alkoholu (278):

$$e^*/1+e^{***}$$

* Poznámka: trombocyty [10⁹/l], GMT [IU/l], věk [roky], cholesterol [mg/dl], ln = tzv. přirozený logaritmus log_e(x), kde e = 2,718.

** Poznámka: AST [ULN], ULN = upper limit of normal, tj. hodnota AST je vyjádřena v ná- sobcích oproti hornímu limitu normy dané laboratoře, trombocyty [10⁹/l].

*** Poznámka: * = -10,929 + (1,827 × lnAST) + (0,081 × věk) + (0,768 × abúzus alkoholu, tj. stupeň 0–2) + (0,385 × HOMA-IR) – (0,447 × cholesterol) AST [IU/l], věk [roky], cholesterol [mmol/l]. Abúzus alkoholu v minulosti (nikoliv pouze recentní): stupeň 0 (< 10 g/d), stupeň 1 (10–40 g/d), stupeň 2 (> 40 g/d).

HOMA-IR = inzulinová rezistence hodnocená pomocí „homeostasis model assessment“, tj. hladina inzulinu nalačno [mU/ml] × glykemie [mmol/l] / 22,5 (279).

Hraniční hodnoty: $< 0,2$ pro pacienty bez významnější fibrózy (senzitivita 96 %, negativní předpovědní hodnota 93 %) a $> 0,8$ pro záchyt významné fibrózy (specifita 94 %, pozitivní předpovědní hodnota 87 %). Při použití těchto hraničních hodnot bylo možné klasifikovat 48 % nemocných.

Ze studií nepřímých markerů fibrózy lze pro denní klinickou praxi již nyní využít následující poznatky:

1. poměr AST/ALT nad 1 u nemocných s virovým a steatofibrotickým postižením je velmi často spojen s progresivní fibrózou či cirhózou;
2. patologické hodnoty GMT a protrombinového času (součásti PGA indexu) jsou známkami pokročilejších stadií fibrózy.

Přímé markery fibrózy

Mezi přímé markery fibrózy řadíme řadu sérových nebo močových látek, u nichž se prokázalo, že jsou přímo zapojeny v metabolismu extracelulární matrix (viz tabulka 1.3), nebo se u nich alespoň přímá účast předpokládá. Obrat ECM je sdružen s ukládáním a odbouráváním jak nové, tak stávající ECM. Mezi přímé markery řadíme jak různé cytokiny, tak markery fibrózy. Zařazení podporují tyto nálezy:

1. laboratorní hodnoty těchto markerů jsou nejvíce zvýšené během těžkých stavů s progresivní fibrózou (např. těžká alkoholická hepatitida) a důvodem je nejspíše vyšší novotvorba ECM;
2. hodnoty mají tendenci poklesnout při úspěšné léčbě základní choroby, a to ještě někdy i před změnami detekovatelnými v histologickém vzorku tkáně;
3. u chronických jaterních chorob korelují některé z těchto markerů se stupněm fibrózy více než s biochemickými či histologickými známkami zánětu (280, 281, 282, 283).

Korelace mezi různými markery fibrózy je obvykle dobrá, což lze vysvětlit tím, že měří obdobné (pato-)fyziologické procesy (284). Navíc je korelace mezi kvantitativním zpracováním obrazů jaterní tkáně a různými markery fibrózy minimálně stejně přesná při porovnání semikvantitativního zpracování tkáně (např. Knödellovo skóre) s těmito markery. Což nemusí být natolik překvapivé, uvědomíme-li si třeba chybu při odběru histologického vzorku, jeho částečně subjektivní zpracování apod.

Přímé markery lze rozdělit do tří skupin podle vztahu k obratu ECM (viz tabulka 1.3). Na markery se vztahem k:

1. vyššímu ukládání ECM;
2. k zvýšenému odstraňování ECM;
3. s nejasným vztahem k předchozím procesům.

Jinou možností klasifikace přímých markerů je klasifikace biochemická:

1. kolageny (prokolagen I a III, propeptidy těchto kolagenů, kolagen IV);
2. glykoproteiny a polysacharidy (hyaluronan, laminin, tenascin, YKL-40) spojené s metabolismem bazální membrány;
3. kolagenázy a jejich inhibitory (MMP a TIMP) a
4. cytokiny fibrózy (TGF-beta, PDGF, interleukin IL-10).

Žádný z těchto markerů není specifický pouze pro játra, mají další zdroje, nejenom v kostech, chrupavce, ale i v plicích, kůži apod. Směšují aktivitu remodelace stávající matrix, depozici nové a degradaci obou. Hladiny v séru či moči jsou ovlivněny jejich clearencí, metabolismem a vylučováním. Hyaluronan se např. váže na specifické re-