

# Játra jako model pro studium principů regenerace a regulace funkcí buněčných systémů

Jan Vondráček

## Játra a jejich základní funkce

Játra hrají kritickou úlohu při udržování homeostázy v organismu:

- zásadní úloha v **metabolismu** organismu;
- **degradace endogenních látek; detoxifikace** xenobiotik;
- **exokrinní** (tvorba žluči – metabolismus lipidů, exkrece toxických látek) i **endokrinní žláza** (erythropoetin, tvorba vitamínu D3);
- **tvorba složek krve;**
- **imunitní orgán;**

## Játra a jejich základní funkce

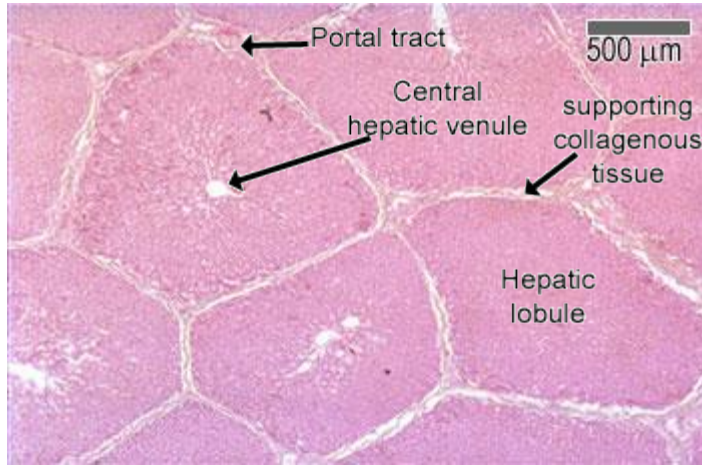
- ▶ játra jsou poškozována celou řadou toxikantů a dalších faktorů;
- ▶ udržení funkčních jater je zcela zásadní pro udržení základních životních funkcí - **unikátní schopnost regenerace**;



## Játra a jejich základní funkce

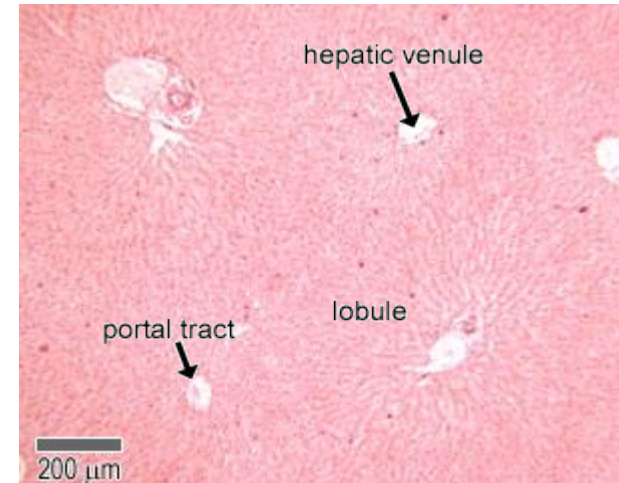
1. stavba jater;
2. vznik a vývoj jater;
3. jaterní zonace a její principy;
4. základní principy regenerace, „kmenové“ buňky jater;

# Histologie jater

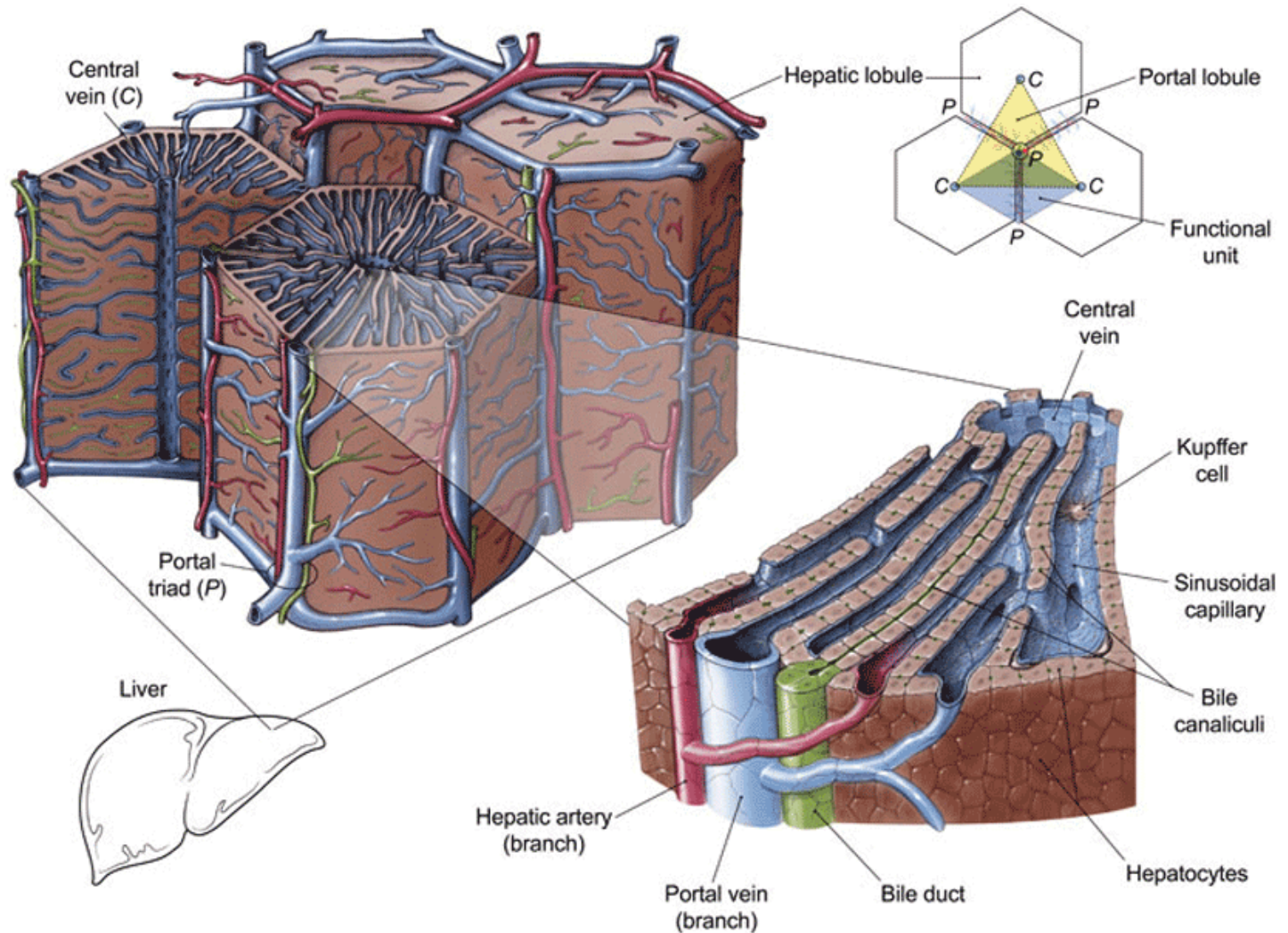


játra prasete

játra králíka

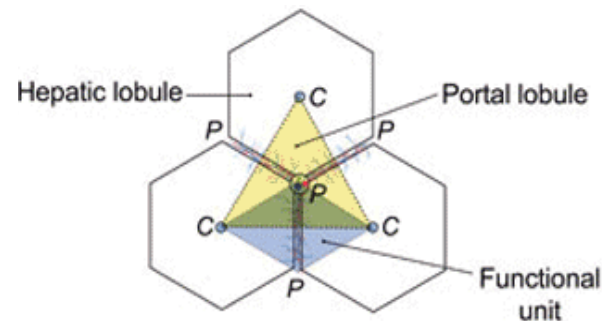
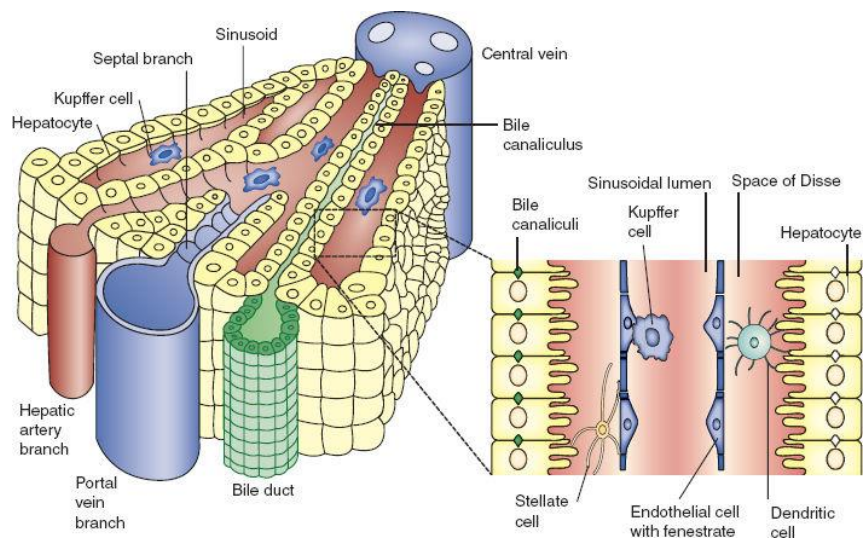


# Mikroskopická anatomie jater



# Členění jater na strukturální podjednotky

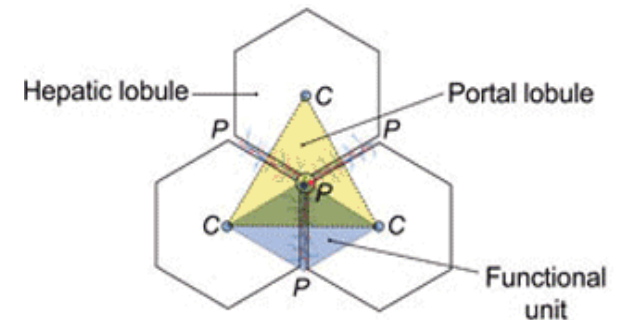
*Nature Rev. Immunol. (2006) 6: 244-251*



## Jaterní lalůček

- **polygonální** útvar ohraničený velmi tenkou vrstvou kolagenního vaziva; v něm je tzv. **portální triáda** – céva napojená na vrátnicovou žílu (*v. portae*), céva napojená na jaterní tepnu (*a. hepatica*) a žlučový kanálek.
- je složený z trámců **hepatocytů** oddělených **jaterními sinusoidami**;
- uprostřed se nachází **centrální žíla**, která odvádí krev do jaterní žíly;

# Členění jater na funkční podjednotky

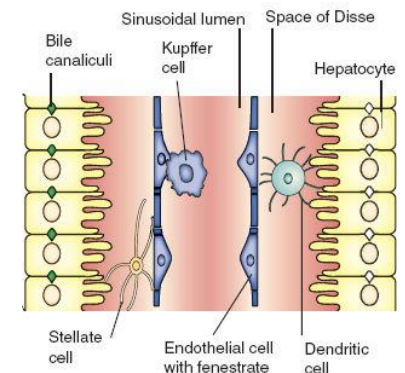


- **portální lalůček** - část jaterního parenchymu, která má vrcholy ve třech centrálních žilách a jeho středem je portální triáda (tvoří trojúhelník); je to oblast, ze které odchází žluč do žlučovodu;
- **primární jaterní acinus** – tvar oválu (dvou spojených trojúhelníků) - nejmenší funkční jednotka jaterního parenchymu; definice jaterní zonace; vrcholem trojúhelníků – 2 centrální žíly;



## Buňky jater

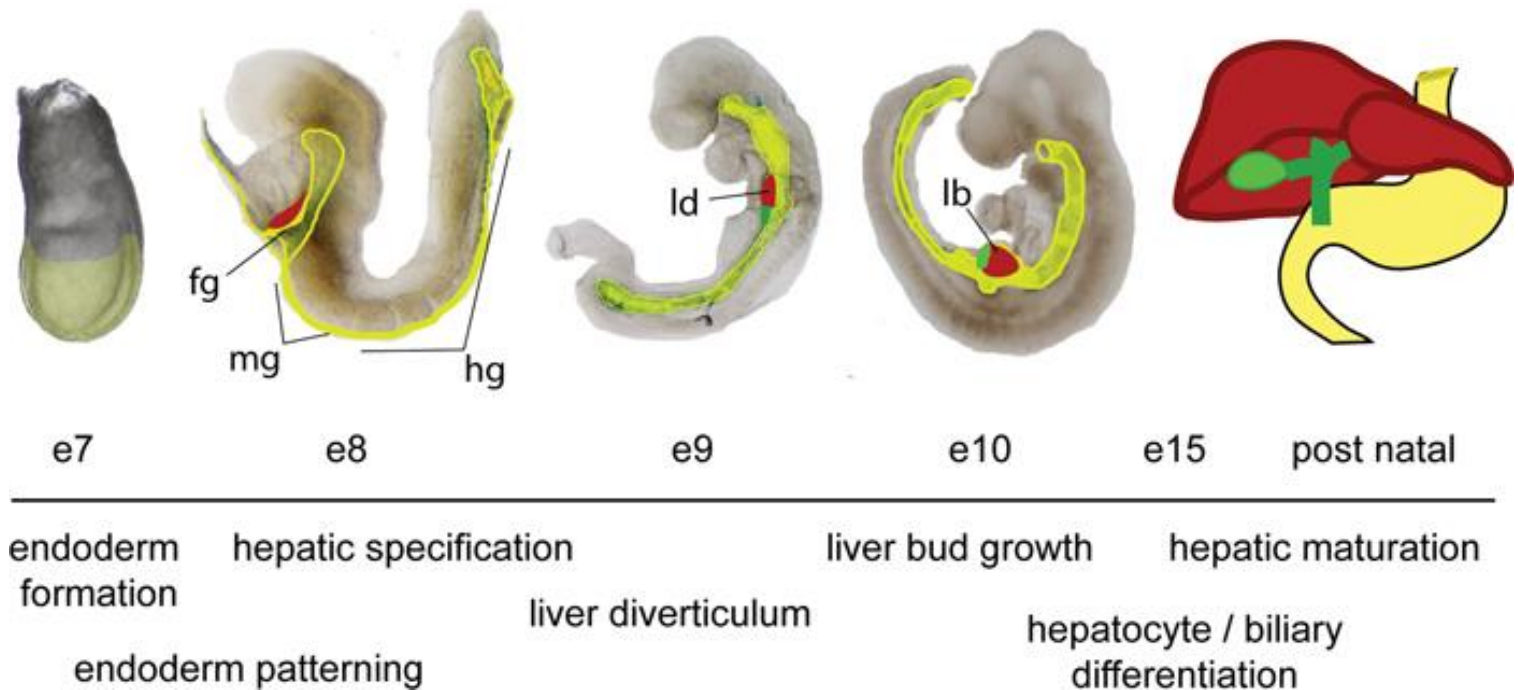
- **hepatocyty** – většina buněk jaterního parenchymu – jaterní epitelální buňky uspořádané do trámců;
- **endoteliální buňky** cév a venózních sinusoidů;
- na povrchu endoteliálních buněk – diferencované makrofágy - **Kupfferovy buňky**;
- mezi endotelem krevních sinusoid a hepatocyty se nachází štěrbina označovaná jako **Disseho prostor** probíhá zde výměna látek mezi krví a hepatocyty – hvězdicovité (stellate cells) **Itovy buňky** – podílejí se na uskladnění tuků a metabolismu vitamínu A;
- **epiteliální buňky žlučových cest**;



## Vývoj jater

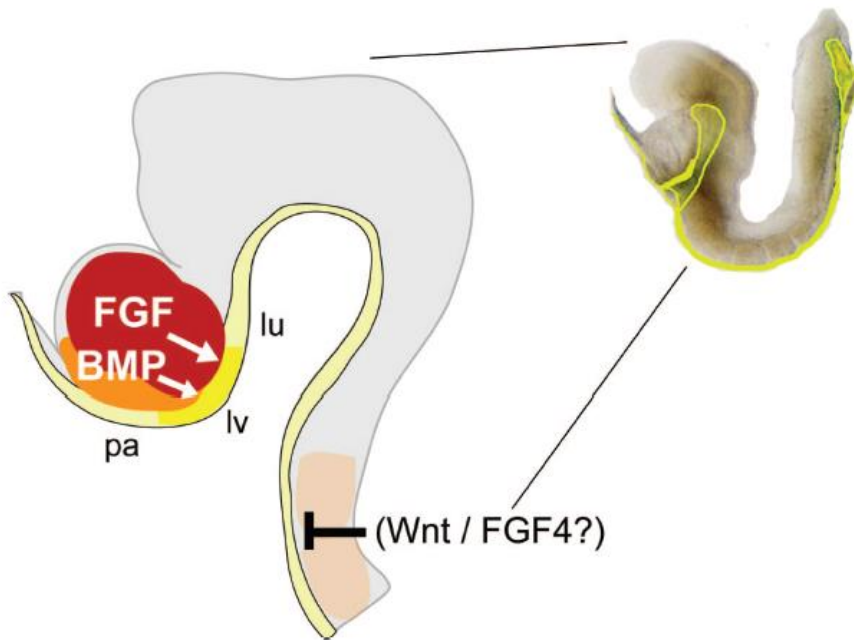
- **játra představují jeden z prvních orgánů vznikajících v průběhu embryogeneze;**
- v průběhu časně embryogeneze představují základní hematopoetický orgán;
- základní kroky: rozčlenění střevní trubice na přední, střední a zadní střevo; vytvoření jaterní výchlípky; vznik jaterního pupenu (zahrnujícího základ žlučníku); proliferace a diferenciacce hepatocytů/buněk žlučového epitelu; maturace jaterní tkáně (postnatálně);

# Vývoj jater myši



Zorn, A.M., *Liver development* (October 31, 2008), *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, doi/10.3824/stembook.1.25.1, <http://www.stembook.org>

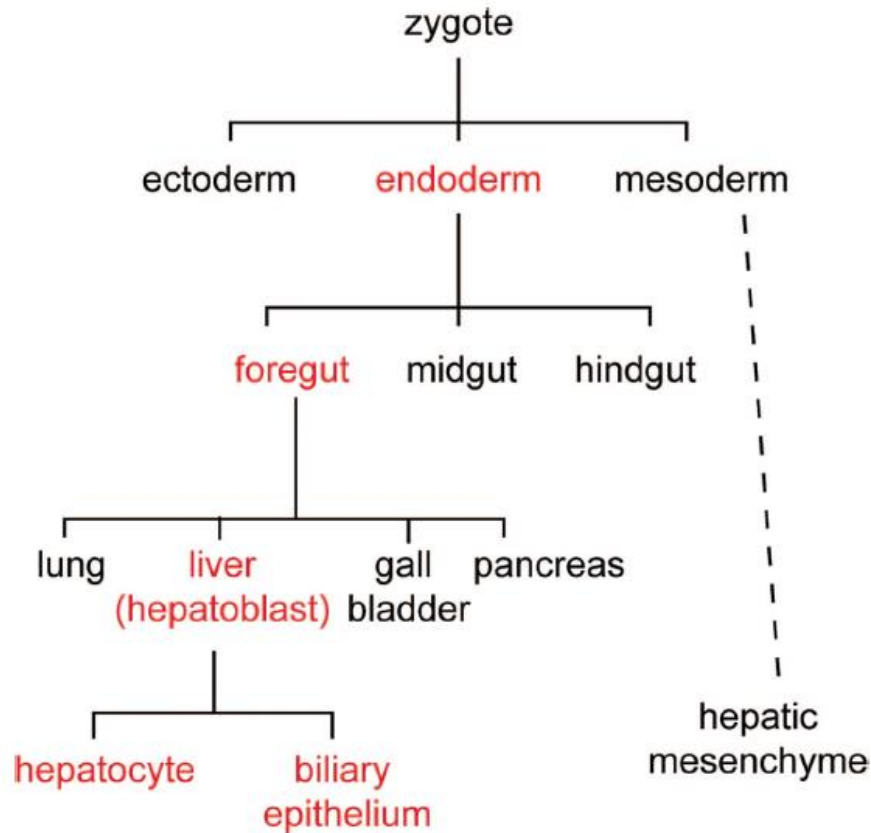
## Vznik jaterní výchlípky/pupenu



- pro indukci tvorby jaterní výchlípky z předního střeva a základu jater je důležité působení FGF a BMP faktorů uvolňovaných z mezodermu - ze základu srdce a septum transversum;
- na opačné straně střevní trubice zároveň vznikají základy slinivky a plic;

Zorn, A.M., *Liver development*  
 (October 31, 2008), *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community,  
*StemBook*, doi/10.3824/stembook.1.25.1, <http://www.stembook.org>

## Původ jaterních buněk



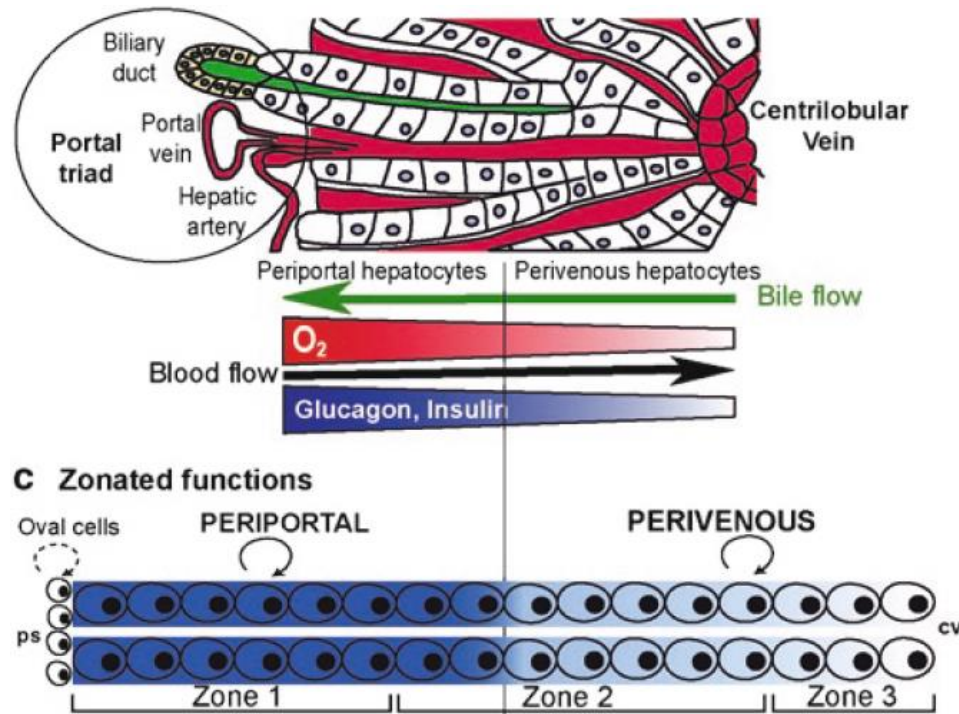
- jaterní epiteliální buňky (hepatocyty, epiteliální buňky žlučových cest - cholangiocyty) jsou entodermálního původu;
- další neparenchymální buňky (Itovy buňky, Kupfferovy buňky, buňky cév) jsou původu mezodermálního;

Zorn, A.M., *Liver development*

(October 31, 2008), *StemBook*, ed. *The Stem Cell Research Community*, *StemBook*, doi/10.3824/stembook.1.25.1, <http://www.stembook.org>

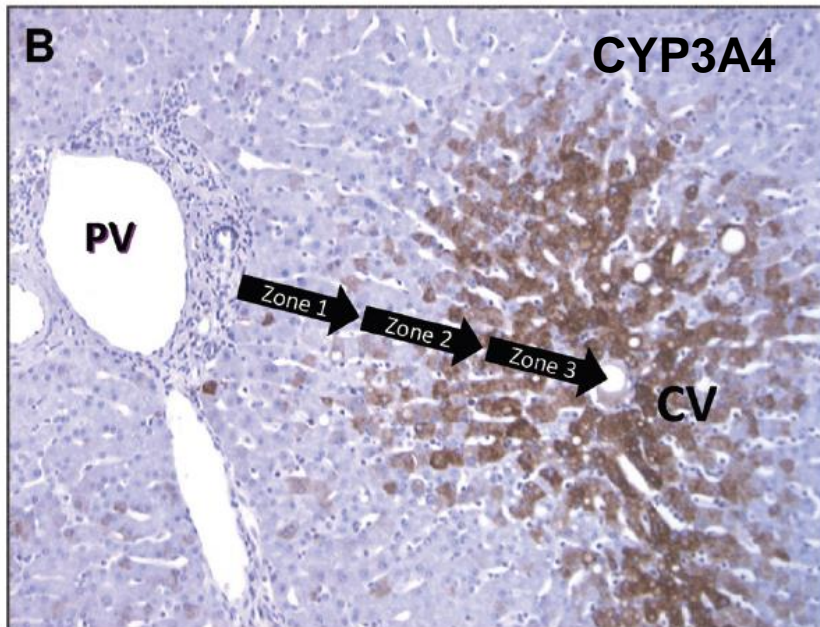
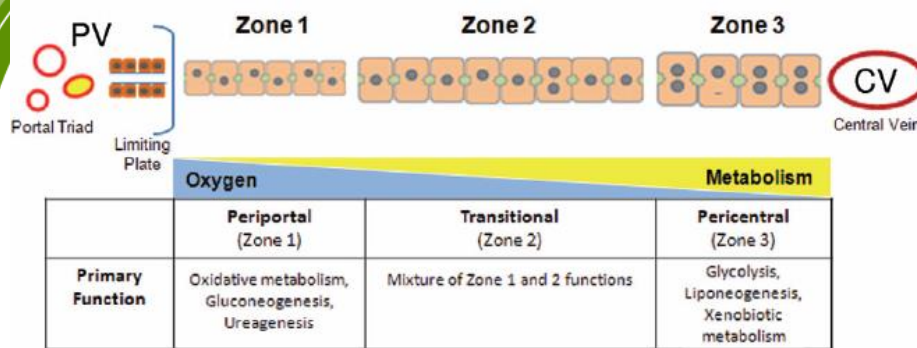
# Hepatocyty a jaterní zonace

- **hepatocyt** – klíčová buňka definující funkce jater – 80% veškerých jaterních buněk;
- přestože se z morfologického hlediska jeví jako uniformní buněčná populace, ve skutečnosti jsou **hepatocyty rozlišené funkčně, v závislosti na jaterní zonaci !!!**



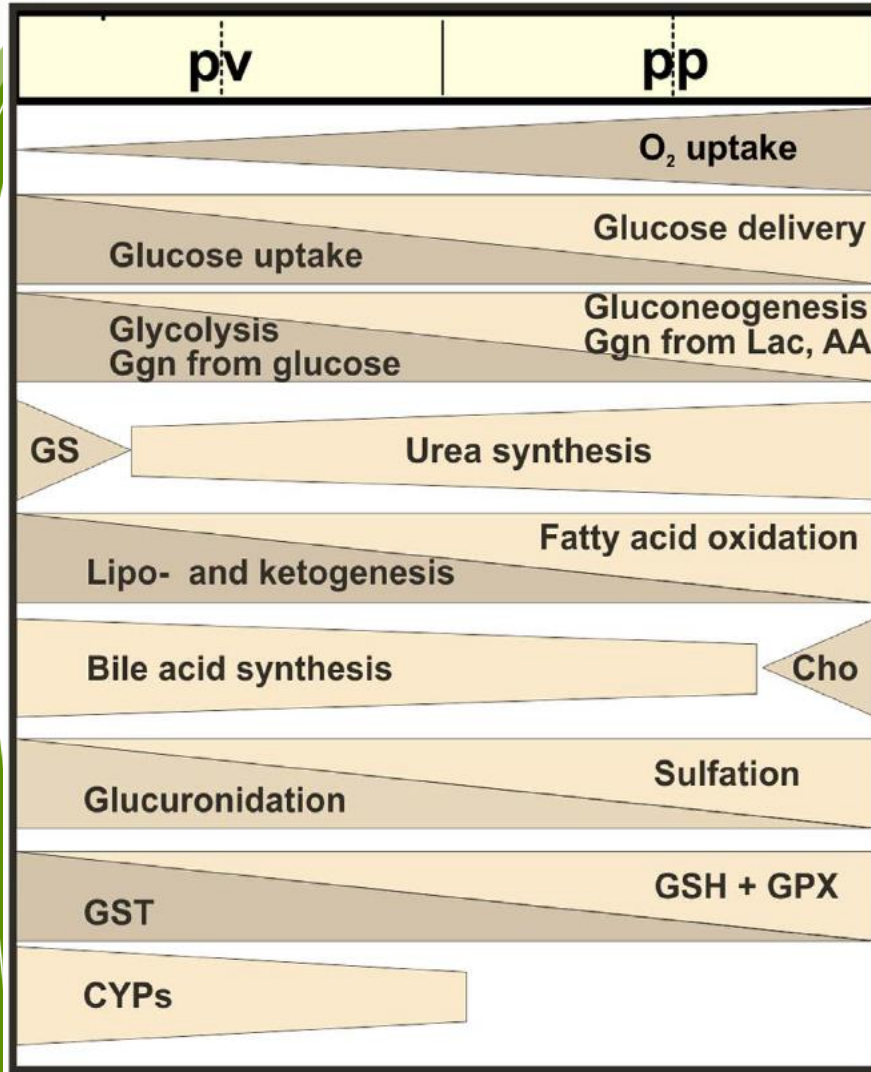
*S.P.S. Monga (ed.),  
Molecular Pathology of Liver  
Diseases, Springer, 2011*

# Hepatocyty a jaterní zonace



- z hlediska funkce a vlastností rozlišujeme hepatocyty:
- **periportální** (dobré zásobení  $O_2$  a živinami, více mitochondrií, méně hladkého ER - oxidativní metabolismus -  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, glukoneogeneze, proteosyntéza, syntéza močoviny);
- **perivenózní** (horší zásobení  $O_2$ , glykolýza, syntéza lipidů, biotransformace xenobiotik – souvisí s větším množstvím hladkého ER, syntéza glutaminu);
- někdy členěny na **zónu I, II (přechodná) a III**;

# Jaterní zonace metabolismu



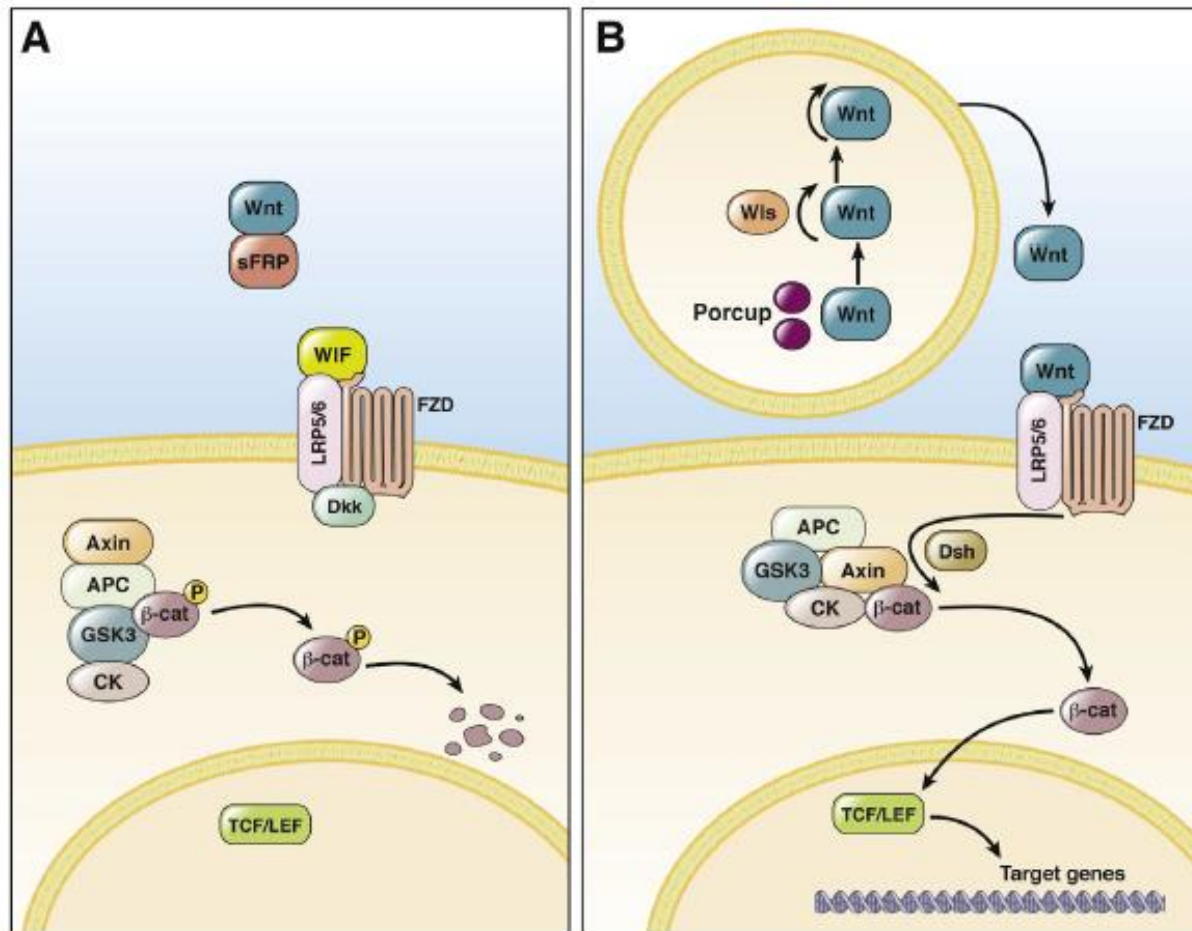
- ▶ nejvýraznější pro **metabolismus glukózy** (glukoneogeneze v periportální oblasti zatímco glykolýza probíhá zejména v perivenózní oblasti);
- ▶ je však ovlivněn i **metabolismus lipidů, žlučových kyselin a xenobiotik**;
- ▶ **metabolismus dusíkatých sloučenin** – konečným produktem v periportální oblasti je močovina, zatímco v perivenózních hepatocytech je to glutamin – př. působení Wnt dráhy – významným cílovým genem pro  $\beta$ -katenin je glutamin syntetáza;



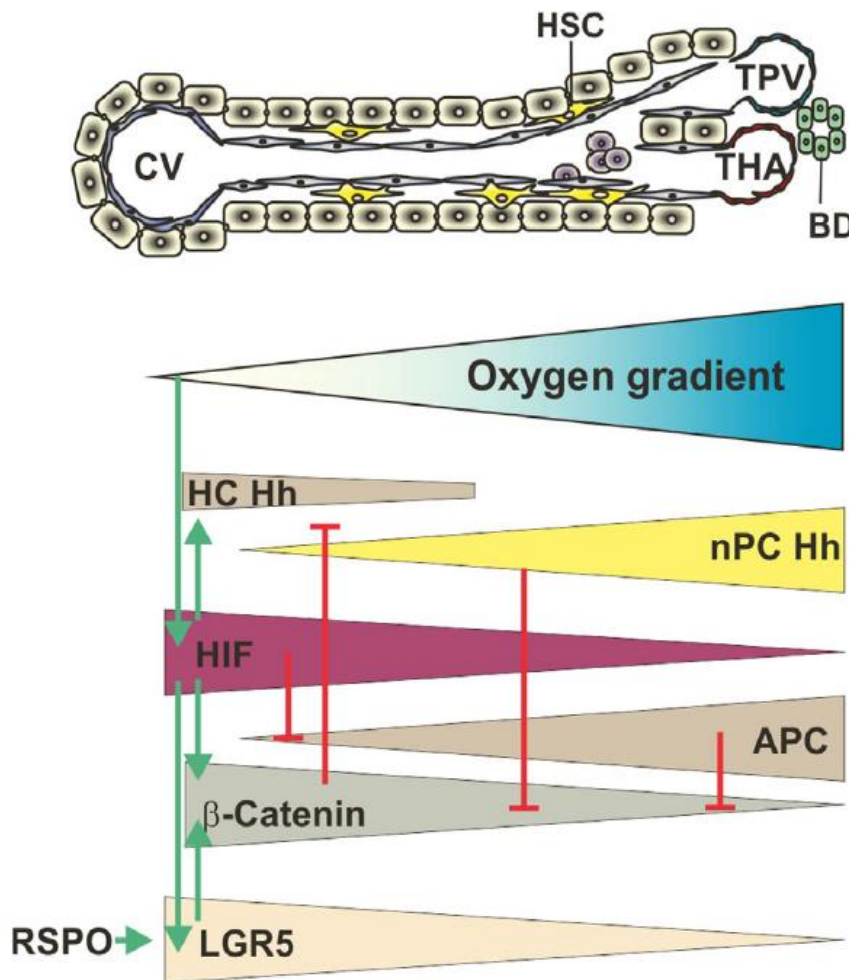
## Mechanismy a signální dráhy řídící jaterní zonaci

- **významnou roli v regulaci jaterní zonace** – funkční diferenciaci zralých hepatocytů – hraje **Wnt/ $\beta$ -kateninová signální dráha**, resp. gradient její aktivity;
- vedle toho se zde uplatňují ale také **další transkripční faktory**, jejichž aktivita může mít gradientový charakter – pravděpodobně nejvýznamnějším příkladem je hepatocytární jaderný faktor alfa – **hepatocyte nuclear factor  $\alpha$  – HNF4 $\alpha$** ;
- **obě dráhy** spolu interagují jak v regulaci základních buněčných funkcí diferencovaných hepatocytů, tak **mají zásadní dopad na procesy spojené s regenerací jater a rozvojem jaterních onemocnění, včetně hepatokarcinogeneze**;
- **gradienty aktivity specifických signálních drah** tak mají význam nejen v embryogenezi/morfogenezi, ale také v regulaci funkcí diferencovaných buněk v dospělém organismu;

# Wnt/ $\beta$ -kateninová dráha v játrech

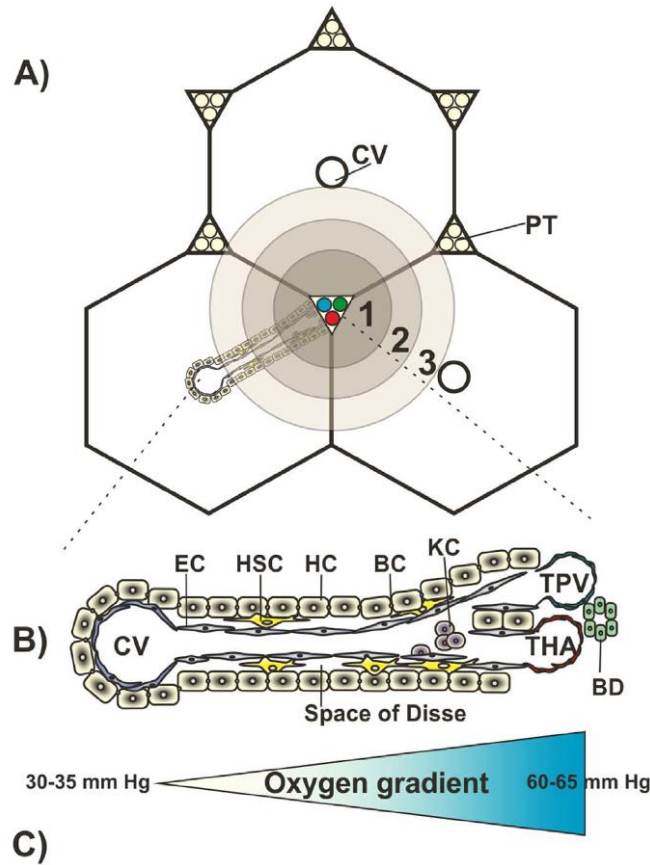


# Gradient aktivity Wnt/ $\beta$ -kateninová dráhy v játrech



- ▶ v periportálních hepatocytech – vysoká hladina APC – blokuje  $\beta$ -kateninovou signalizaci;
- ▶ v perivenózních hepatocytech – nízká hladina APC, aktivní  $\beta$ -kateninová dráha;
- ▶ aktivita  $\beta$ -kateninové dráhy je dále podpořena aktivací prostřednictvím Rspodin/LGR5 signalizace a modulována dalšími transkripčními faktory (HIF1 $\alpha$ );

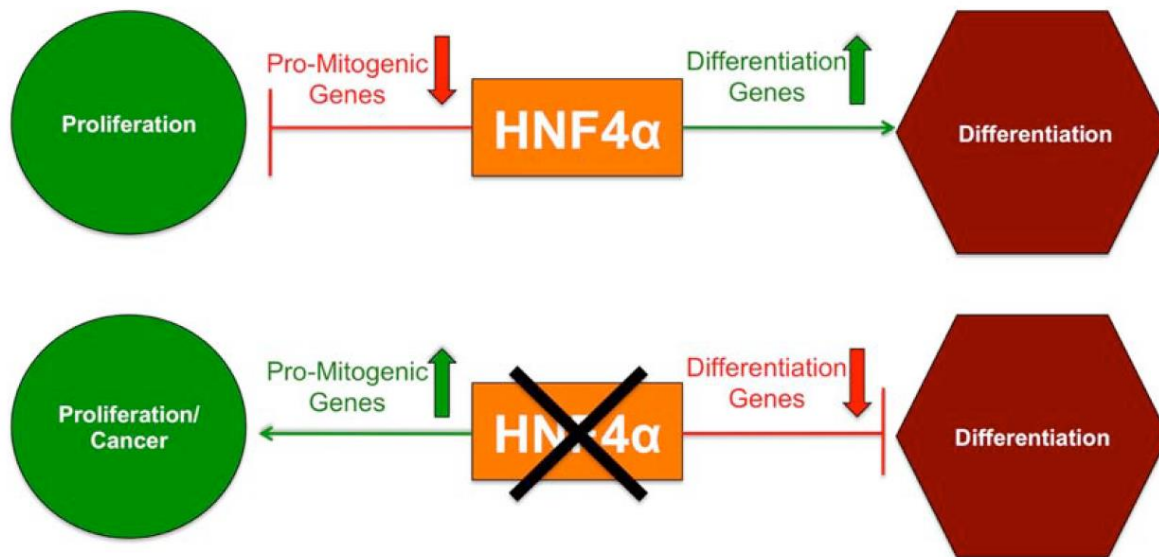
# Jaterní zonace částečně souvisí s hladinou O<sub>2</sub>



- ▶ parciální tlak kyslíku klesá od PP do PC oblasti;
- ▶ dostupnost O<sub>2</sub> může ovlivnit reakce metabolismu endogenních látek i xenobiotik;
- ▶ hladina kyslíku také ovlivňuje aktivitu proteinů regulovaných hypoxií, jako je HIF1 $\alpha$ ;

## HNF4 $\alpha$

- **HNF4 $\alpha$**  – jaderný receptor – transkripční faktor fungující jako homodimer;

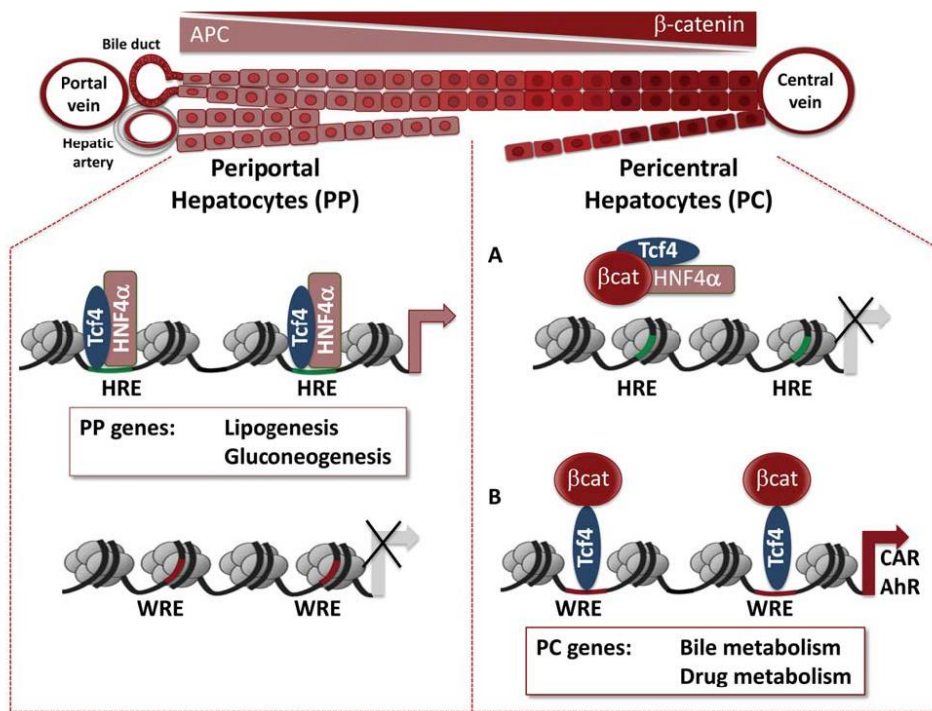


- v hepatocytech – **nízká hladina podporuje proliferaci, dediferenciaci, zatímco vysoká hladina podporuje diferenciaci;**

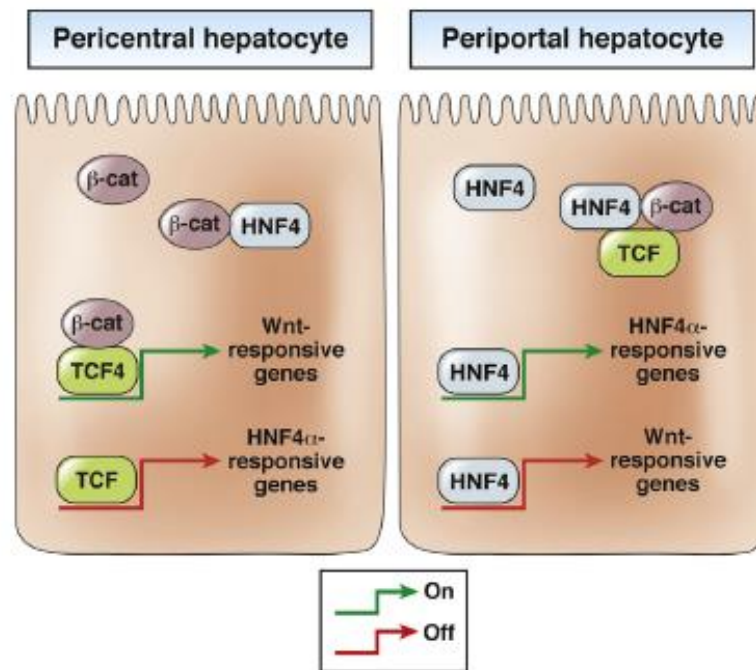
## HNF4 $\alpha$

- **HNF4 $\alpha$**  – vysoká hladina zejména v játrech a ledvinách;
- **přímo reguluje transkripci genů spojených s glykolýzou, glukoneogenezí, tvorbou močoviny, žlučových kyselin, metabolismem tuků, xenobiotik, tvorbou apolipoproteinů i faktorů podílejících se na srážení krve;**
- **spolupracuje s dalšími jadernými receptory kontrolujícími metabolismus v játrech** – konstitutivní androstanový receptor (CAR) pregnanový X receptor (PXR), receptor pro peroxizómové proliferátory  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ );

# Rovnováha signalizace $\beta$ -kateninu a HNF4 $\alpha$ definuje genovou expresi v hepatocytech

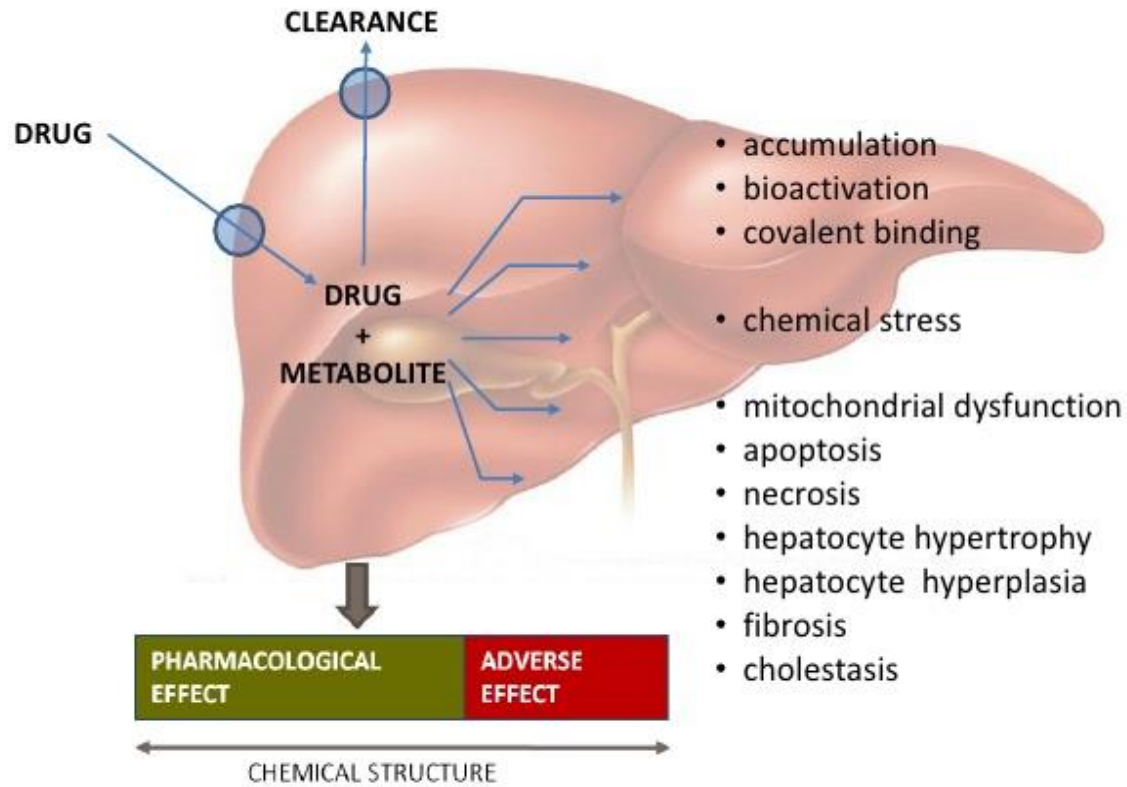


*Hepatology (2014) 16: 2081 - 2082*



*Gastroenterology (2015) 148:1294–1310*

# Játra jsou orgán vystavený toxickému působení řady látek – schopnost regenerace

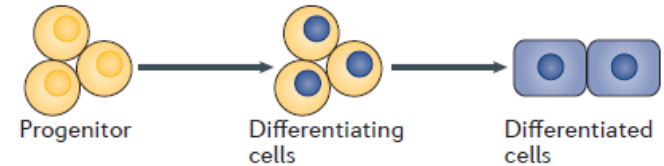




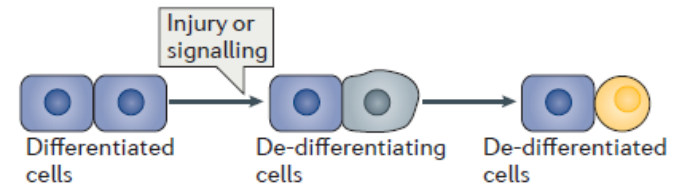
# Játra – schopnost regenerace – dediferenciace a transdiferenciace

- tkáně v dospělém organismu – rozdílná schopnost regenerace;
- **rychle se obnovující tkáně** – střevní epitel, krevní buňky, pokožka – **populace rezidentních kmenových buněk**;
- **tkáně s velmi limitovanou obnovou** – nervová tkáň, srdeční svalovina;
- **tkáně se schopností regenerace po poranění, poškození** – plicní epitel, **játra** – obnova z tzv. **dospělých progenitorů**, nebo procesy **dediferenciace a transdiferenciace**;

**a Differentiation**

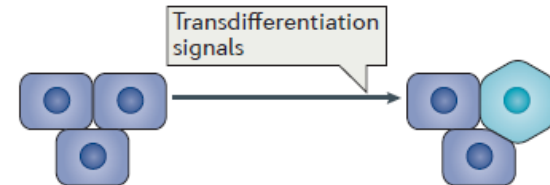


**b De-differentiation**

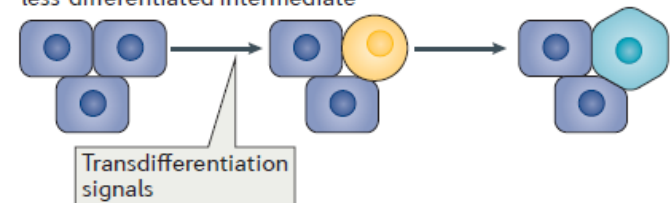


**c Transdifferentiation**

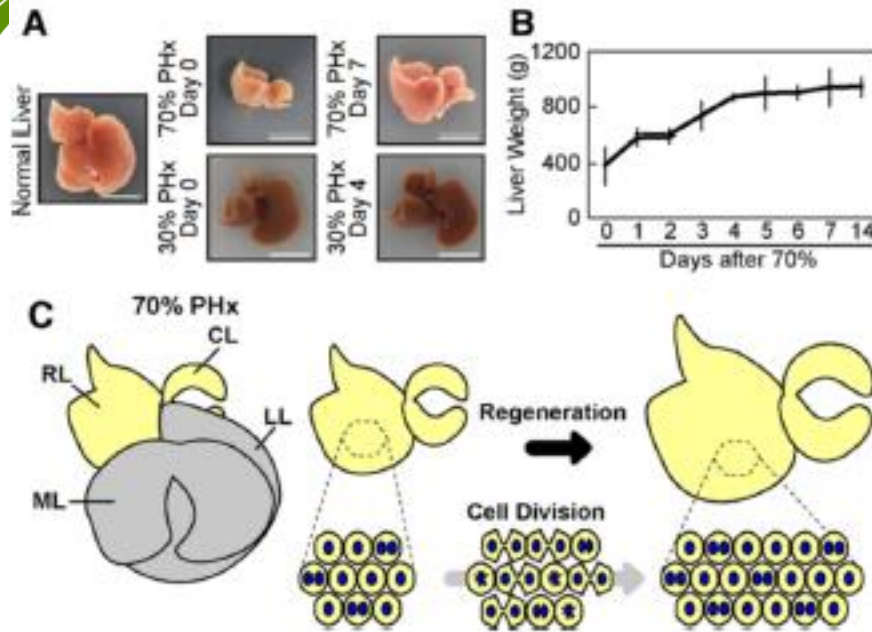
Direct transdifferentiation



Transdifferentiation through a less-differentiated intermediate



# Schopnost regenerace po částečné hepatektomii



Miyaoka and Miyajima *Cell Division* 2013, 8:8

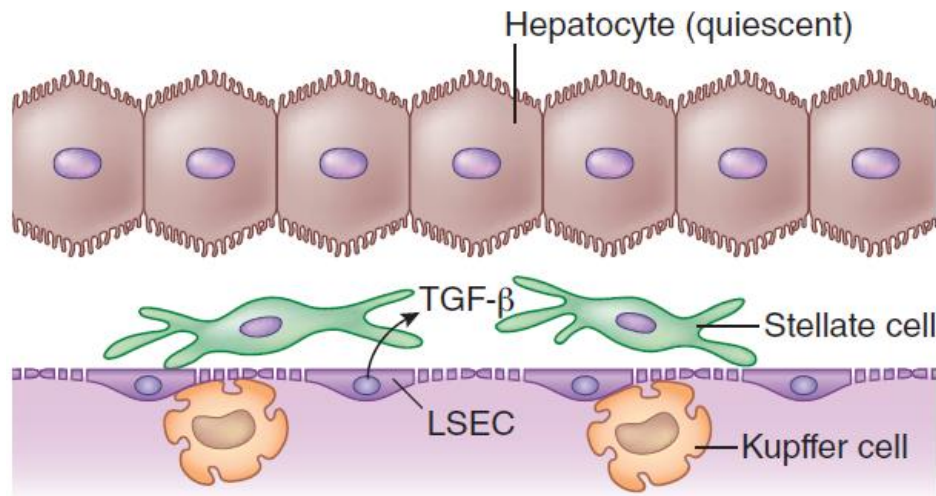
Regenerace po hepatektomii = hepatocyty & epiteliální buňky žlučových cest

Schopnost regenerace jater myši po částečné hepatektomii je obrovská – 30 opakování – odpovídá jedné buňce

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Path Lab Med.* 1931;12:186–202.

# Hepatocyty jsou v klidovém stavu

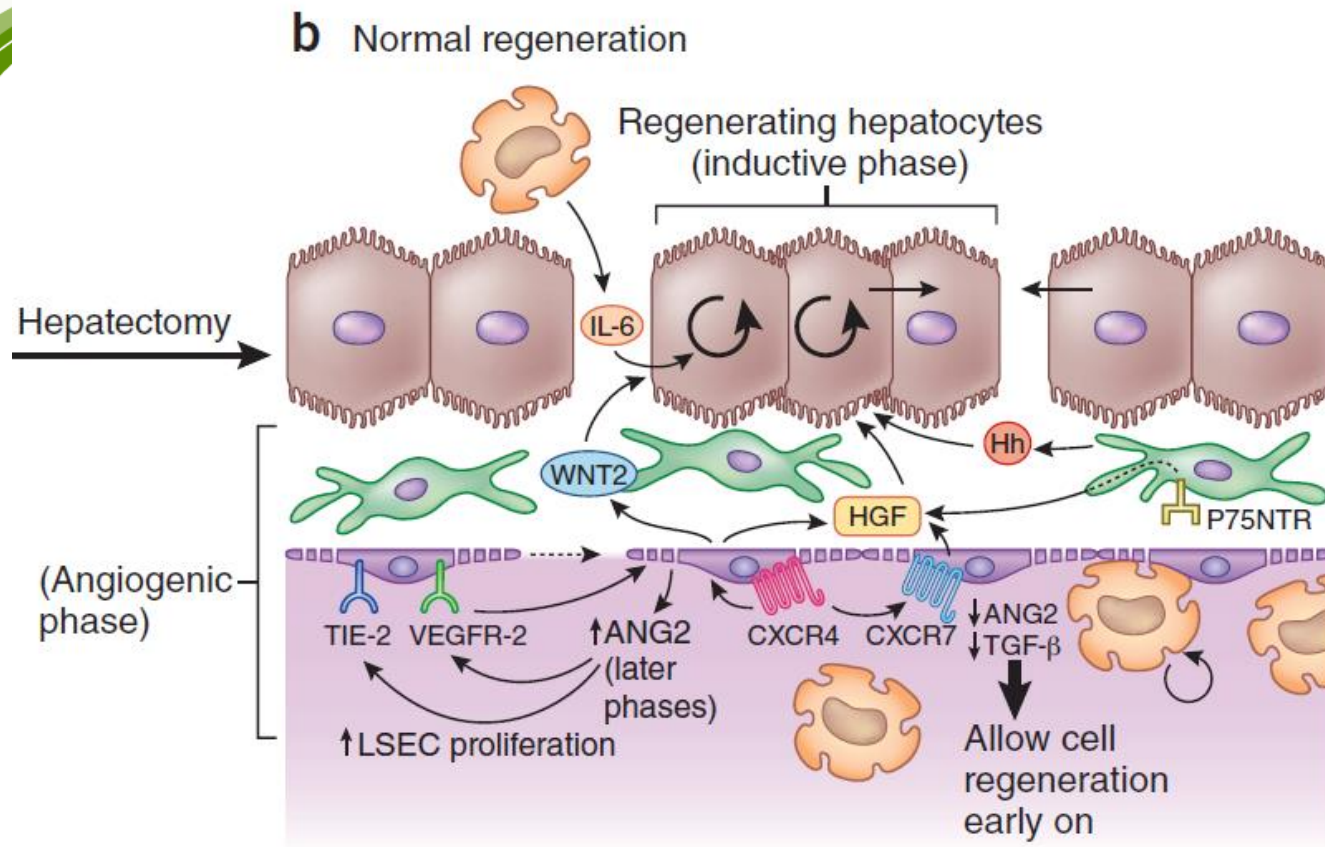
a Normal resting liver



*Nature Med. (2014) 20: 857-869*

- **TGF $\beta$**  produkovaný sinusoidálními endoteliálními buňkami indukuje zástavu buněčného cyklu u hepatocytů – G<sub>0</sub> fáze buněčného cyklu;

# Po hepatektomii nebo akutním poškození jater dochází k aktivaci proliferace hepatocytů a buněk ž. epitelu



*Nature Med. (2014) 20: 857-869*

- solubilní faktory produkované endot. buňkami, Itoovými buňkami a Kupfferovými buňkami stimulují proliferaci hepatocytů a buněk žlučových cest;

## Po hepatektomii nebo akutním poškození jater dochází k aktivaci proliferace hepatocytů a buněk ž. epitelu

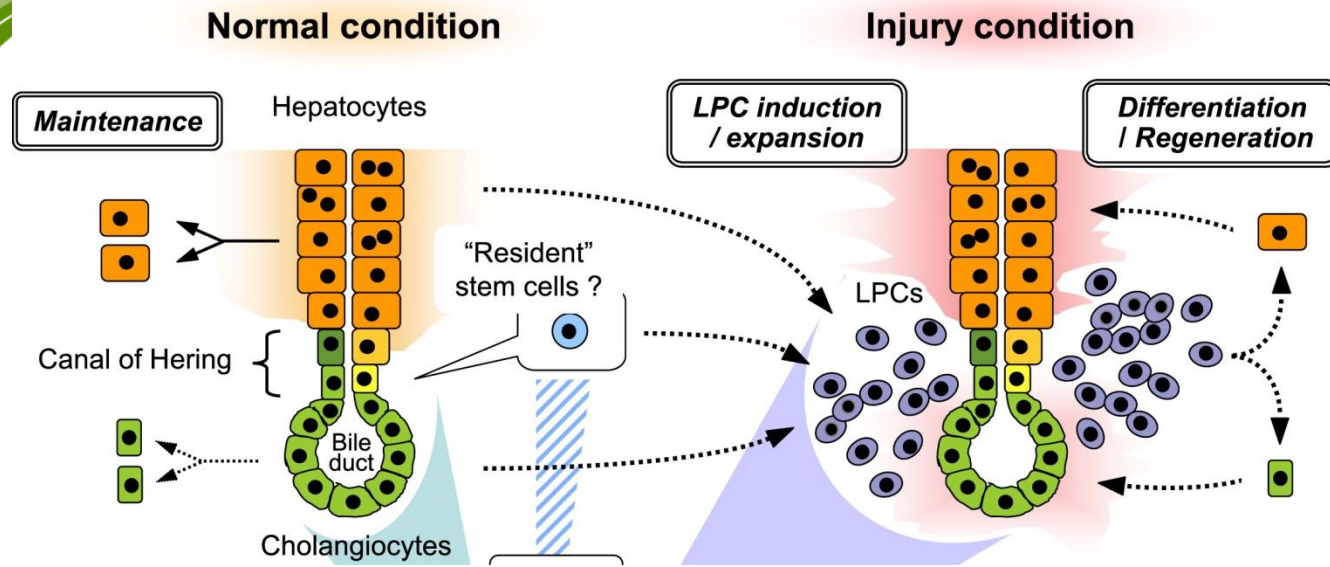
- **koordinovaná mobilizace jaterních růstových faktorů, remodelace ECM a přísně kontrolovaná proliferace epiteliálních buněk;**
- endoteliální buňky neuvolňují TGF- $\beta$  během časně fáze regenerace, naopak sekretují HGF, WNT2 a cytokiny (CXCR7, CXCR4); Itovy buňky produkují HGF a hedgehog (Hh), zatímco Kupfferovy buňky sekretují cytokin IL-6;
- to stimuluje proliferaci hepatocytů (spojenou s částečnou dediferenciací), následovanou proliferací neparenchymálních buněk;
- proces je velice rychlý – **7 -10 dní u myši, 6 – 8 týdnů u člověka;**
- **pro normální regeneraci nejsou v játrech třeba specializované populace kmenových buněk;**



## Po hepatektomií nebo akutním poškození jater dochází k aktivaci proliferace hepatocytů a buněk ž. epitelu

- nicméně i v podmínkách chronického poškození si játra udržují jistou schopnost regenerace – **využití progenitorových buněk?**
- **duktulární reakce** – tvorba bipotentních progenitorových buněk;
- to naznačuje velkou plasticitu jaterních buněk – možnost dediferenciace hepatocytů?, specifické populace progenitorových buněk?, perivenózní hepatocyty (vysoká aktivita  $\beta$ -kateninové dráhy) jako kmenové buňky jater?

„Adult liver progenitor cells“ – kontroverzní úloha v obnově jaterní tkáně



Cell Stem Cell (2014) 14: 561-574

**Kontroverze:**

- existují skutečné kmenové buňky v játrech?
- fakultativní kmenové buňky – hepatocyty, progenitorové buňky?
- pokud ano – které a kdy se zapojují?



## K zamyšlení

- ▶ přestože morfologicky představují hepatocyty relativně homogenní populaci buněk, lze rozlišovat odlišné populace buněk jejichž funkční vlastnosti závisejí na jaterní zonaci;
- ▶ **gradienty tak** hrají významnou roli nejen morfogenní (v embryonálním vývoji), ale **mohou významně regulovat i funkce diferencovaných buněk v dospělých tkáních**; v játrech nejsou dány jen aktivitou specifických signálních drah, ale také gradientem hladiny kyslíku (a metabolitů);
- ▶ **jaterní zonace daná gradientem aktivit transkripčních regulátorů**, jako jsou  $\beta$ -katenin a HNF4 $\alpha$ , hraje úlohu **v regulaci metabolismu hepatocytů, a to jak endogenních látek** (cukry, lipidy, močovina, některé aminokyseliny) **tak i xenobiotik – řídí tedy rozdělení základních funkcí jaterních buněk v rámci základních morfologických jednotek jater** – jaterního lalůčku či primárního acinu;

## K zamyšlení

- ▶ **regenerace poškozených jater** ve většině případů probíhá prostřednictvím částečné **dediferenciace a masivní proliferace hepatocytů**;
- ▶ v případě, že je **schopnost hepatocytů proliferovat omezená** – onemocnění, působení toxikantů – může dojít k **obnově jater ze specifických populací „adult progenitor cells“**;
- ▶ **identita buněk, sloužících jako zdroj pro normální obnovu jater a regeneraci v případě jejich poškození, není zcela jasná** – specifické populace hepatocyty?, progenitorové buňky (epiteliálního původu)? – podobně jako u jiných orgánů (např. srdce) není tedy zcela jasné zda (a v jaké podobě) se v játrech vyskytují kmenové buňky;