

Uloga signalnog puta Notch u jetrenim zvjezdolikim stanicama tijekom razvoja mišjeg modela jetrene fibroze

Šisl, Dino

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:172397>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dino Šisl

**Uloga signalnog puta Notch u jetrenim
zvjezdolikim stanicama tijekom razvoja mišjeg
modela jetrene fibroze**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dino Šisl

**Uloga signalnog puta Notch u jetrenim
zvjezdolikim stanicama tijekom razvoja mišjeg
modela jetrene fibroze**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga.

Izrada ove doktorske disertacije omogućena je sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga Notch signalnog puta u patogenezi jetrene fibroze“ (HRZZ-UIP-1965; voditelj prof. dr. sc. Tomislav Kelava).

Voditelj rada: prof.dr.sc. Tomislav Kelava

Rad sadrži 53 slike i 1 tablicu.

ZAHVALA:

Zahvaljujem svom mentoru prof.dr.sc. Tomislavu Kelavi na savjetima, pomoći, strpljenju i podršci tijekom pisanja rada, izvođenja pokusa i u rješavanju svakodnevnih problema, izazova i nedoumica. Zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za molekularnu imunologiju, bez kojih ova disertacija ne bi nikada bila gotova, a dolasci na posao i radni dani ni približno ovako zabavni. Neizostavna zahvala ide i društvu iz Ketitransa, kao i Odboru iz kuhinje za sve prekrasne jutarnje sastanke, domjenke i proslave.

Posebna zahvala mojim najbližima za svu ljubav i podršku kroz sve lijepe i one manje lijepe trenutke ovih godina.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Fibroza jetre.....	2
1.1.1. Podrijetlo jetrenih miofibroblasta u cirozi jetre	3
1.1.2. HSC i njihova uloga u patogenezi jetrene fibroze.....	4
1.2. Životinjski modeli jetrene fibroze	8
1.2.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl ₄	9
1.2.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidina	9
1.3. Signalni put Notch	11
1.3.1. Uloga signalnog puta Notch u razvoju tkiva i organa	14
1.3.2. Signalni put Notch u razvoju i bolestima jetre	15
2. HIPOTEZA.....	17
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	18
3.1. Opći cilj	18
3.2. Specifični ciljevi	18
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. Plan istraživanja	19
4.2. Pokusne životinje	20
4.2.1. Prva faza istraživanja	21
4.2.2. Druga faza istraživanja	23
4.2.3. Treća faza istraživanja	24
4.2.4. Četvrta faza istraživanja	26
4.2.5. Peta faza istraživanja	27
4.3. Genotipizacija pokusnih životinja metodom PCR	27
4.4. Izazivanje jetrene fibroze.....	28
4.5. Histološka analiza	28
4.6. Aktivnost aminotransferaza.....	29
4.7. Mjerenje sadržaja kolagena u jetri	29
4.8. Izolacija i kultura jetrenih zvjezdolikih stanica.....	29
4.9. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica	30
4.10. Analiza izraženosti gena metodom qPCR	30
4.11. Statistička analiza	32

5. REZULTATI	33
5.1. Prva faza istraživanja	33
5.1.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl ₄	33
5.1.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC	37
5.2. Druga faza istraživanja	42
5.2.1. Obilježavanje stanica koje izražavaju α SMA prije izazivanja fibroze	42
5.2.2. Obilježavanje stanica koje izražavaju α SMA nakon izazivanja fibroze	43
5.3. Treća faza istraživanja	47
5.3.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl ₄	47
5.3.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC	50
5.4. Četvrta faza istraživanja	53
5.4.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl ₄	53
5.4.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC	55
5.4.3. Model aktivacije signalnog puta Notch s oporavkom od tretmana	60
5.4.3.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl ₄	60
5.4.3.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC	63
5.5. Peta faza istraživanja	66
5.5.1. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC	66
6. RASPRAVA	72
6.1. Signalni put Notch aktiviran je u patogenezi jetrene fibroze	72
6.2. Stanice koje su bazalno pozitivne na α SMA ne diferenciraju se u znatnoj mjeri u miofibroblaste tijekom razvoja jetrene fibroze u istraživanim modelima	73
6.3. Inhibicija transkripcijskog čimbenika Rbpjk u stanicama koje izražavaju α SMA ne dovodi do blažeg razvoja fibroze u istraživanim modelima jetrene fibroze	74
6.4. Aktivacija signalnog puta Notch1 u stanicama koje izražavaju α SMA ne dovodi do jače fibroze u proučavanim modelima jetrene fibroze	76
6.5. Tamoksifen pokazuje zaštitnu ulogu u kolestatskom (DDC) modelu jetrene fibroze	77
7. ZAKLJUČCI	81
8. SAŽETAK	82
9. SUMMARY	83
10. POPIS LITERATURE	84
11. ŽIVOTOPIS	92

POPIS KRATICA

Acta2 – aktin alfa 2 glatkog mišića, prema engl. *actin alpha 2, smooth muscle*

α SMA – alfa aktin glatkog mišića, prema engl. *alpha smooth muscle actin*

ALT – alanin-aminotransferaza

AST – aspartat-aminotransferaza

BDL – podvezivanje zajedničkog žučovoda, prema engl. *bile duct ligation*

CCL – kemokinski ligand s C-C motivom

CCl4 – ugljikov tetraklorid

CCR – receptor za C-C kemokin

CD – razlikovni biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*

Colla1 – lanac alfa 1 kolagena tipa I, prema engl. *collagen type I alpha 1 chain*

CSL – prema engl. *CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1*

DDC – 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidin

EGF – epidermalni čimbenik rasta, prema engl. *epidermal growth factor*

FasL – ligand Fas

HES – hes family bHLH transcription factor 1

HEY – hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1

HSC – jetrene zvjezdolike stanice, prema engl. *hepatic stellate cells*

IFN- γ – interferon gama

IL – interleukin

LPS – lipopolisaharid

LRAT – lecitin retinol aciltransferaza

LSEC – endotelne stanice jetrenih sinusoida, prema engl. *liver sinusoidal endothelial cells*

MMP – metaloproteinaza međustanične tvari, prema engl. *matrix metalloproteinase*

NAFLD – nealkoholna bolest jetre, prema engl. *non-alcoholic fatty liver disease*

NASH – nealkoholni steatohepatitis, prema engl. *non-alcoholic steatohepatitis*

NEXT – Notch izvanstanična domena, prema engl. *Notch extracellular truncation*

NF- κ B – jezgreni čimbenik κ B, prema engl. *nuclear factor κ B*

PDGF – trombocitni čimbenik rasta, prema engl. *platelet-derived growth factor*

PPAR γ – prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze, prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*

RBPI κ – prema engl. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*

ROS – reaktivni spojevi kisika, prema engl. *reactive oxygen species*

Sox9 – prema engl. *SRY-box transcription factor 9*

SREBP-1c – prema engl. *sterol regulatory element-binding protein 1c*

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta, prema engl. *transforming growth factor beta*

TIMP – tkivni inhibitor metaloproteinaza, prema engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*

TNF- α – čimbenik nekroze tumora alfa, prema engl. *tumor necrosis factor alpha*

TRAIL – ligand koji inducira apoptozu vezan za TNF, prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula, prema engl. *vascular cellular adhesion molecule*

VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela, prema engl. *vascular endothelial growth factor*

1. Uvod

Kronične jetrene bolesti, kao što su alkoholna bolest jetre, nealkoholni steatohepatitis, virusni hepatitis, autoimune bolesti (primarni sklerozirajući kolangitis i primarni bilijarni kolangitis) i metaboličke bolesti jetre (Wilsonova bolest, nasljedna hemokromatoza, nedostatak α_1 antitripsina) predstavljaju značajan uzrok pobola i smrtnosti, a uzrokuju otprilike 2 milijuna smrti godišnje u svijetu. Ciroza jetre je trenutno na 11., a hepatocelularni karcinom na 16. mjestu među uzrocima smrti. Skupa su uzrok 3,5% svih smrti. Kronične bolesti jetre također predstavljaju i opterećenje za zdravstveni sustav, ne samo zbog zdravstvenih posljedica i liječenja komplikacija, nego su i veliko ekonomsko opterećenje (1-4). Zajedničko obilježje svih kroničnih jetrenih bolesti je fibroza. U početku je ona dio fiziološkog odgovora na oštećenje jetrenog tkiva te je u slučaju uklanjanja čimbenika koji potiče fibrozu reverzibilna, međutim, u slučaju kroničnog tkivnog oštećenja (kronična infekcija, konzumacija alkohola, kronična upala), ona će uznapredovati do završnog stadija jetrene bolesti, ciroze, koja je ireverzibilna, a također nosi i povećan rizik od nastanka hepatocelularnog karcinoma. Klinički, simptomi i znakovi kronične jetrene bolesti razlikuju se od stadija do stadija. U kompenziranom stadiju bolesti, bolesnik može biti i bez simptoma, a uglavnom se javljaju nespecifični simptomi kao što su anoreksija, gubitak tjelesne mase, umor i slabost. Kako bolest napreduje, javlja se sve više simptoma, posebno onih uzrokovanih poremećajem funkcije jetre, a u dekompenziranom stadiju bolesti prisutni su žutica, pruritus, krvarenje iz gornjeg dijela probavnog sustava, ascites i znakovi jetrene encefalopatije. U laboratorijskim nalazima mogu se pronaći povišene koncentracije jetrenih aminotransferaza u serumu, smanjen broj trombocita, kao i odstupanja u testovima koagulacije. Zlatni standard za postavljanje dijagnoze ciroze je patohistološki nalaz, premda nije nužan ako klinička slika, laboratorijske i radiološke pretrage jasno idu u prilog dijagnozi, a patohistološki nalaz ne mijenja terapijski pristup bolesniku. U posljednje vrijeme se dijagnostika sve više oslanja na neinvazivne radiološke metode, od kojih sve veću važnost zauzima ultrazvučna elastografija (3, 4). Iako postoje metode prevencije jetrenih bolesti u vidu apstinencije ili smanjenja konzumacije alkohola, cjepiva (hepatitis B) ili antivirusne terapije (hepatitis C), specifična antifibrotska terapija još uvijek ne postoji te zbog toga transplantacija jetre predstavlja jedini dostupan način liječenja završnog stadija jetrenih bolesti. Iako je transplantacija jetre drugi najčešći tip presađivanja solidnih organa, samo se 10% potrebnih presađivanja i izvede, a bolesnici na transplantacijskoj

listi često umiru zbog zatajenja jetre, infekcija ili pojave i progresije hepatocelularnog karcinoma, što dodatno naglašava potrebu za uzročnim liječenjem. Za pronalazak učinkovite uzročne terapije nužno je dodatno razjasniti molekularne mehanizme nastanka i povlačenja fibroze. (1). Nedavne studije su utvrdile moguću ulogu signalnog puta Notch u patogenezi jetrene fibroze i potencijalni pozitivan učinak njegove inhibicije na njen razvoj, što otvara mogućnost terapijske primjene i razvoja antifibrotskih lijekova koji bi djelovali putem inhibicije signalnog puta Notch (5, 6).

1.1. Fibroza jetre

Fibroza jetre odgovor je na tkivno oštećenje, a karakterizira ju aktivacija miofibroblasta i pojačano odlaganje izvanstaničnog matriksa koje dovodi do promjene normalne tkivne arhitekture te posljedične disfunkcije organa. Razvija se u gotovo svih osoba s kroničnom jetrenom bolešću bez obzira na njenu etiologiju. Za razliku od kroničnih, akutne samoograničavajuće jetrene bolesti ne dovode do razvoja fibroze bez obzira na prisustvo velikog broja čimbenika koji potiču razvoj fibroze. Za razvoj fibroze obično je potrebno nekoliko mjeseci ili čak godina neprekidnog tkivnog oštećenja. Oštećenje jetrenog tkiva, nakon kojeg se javljaju upala i aktivacija prirođenog imunosnog odgovora dovodi do fibroze. U toj upalnoj reakciji sudjeluju Kupfferove stanice, makrofazi podrijetlom iz koštane srži, neutrofili, dendritičke stanice, kao i limfociti T. Kupfferove stanice imaju središnju ulogu u jetrenoj upali. U odgovoru na oštećenje hepatocita, one se aktiviraju te u ovisnosti o signalima koje dobiju iz svog okoliša, izražavaju biljege slične makrofazima tipa M1 ili M2. Upala u jetri je regulirana ravnotežom između proupalnih Kupfferovih stanica tipa M1 i protuupalnih tipa M2. Makrofazi koji na mjesto upale dolaze iz koštane srži imaju važnu ulogu i u akutnoj i u kroničnoj upali jetre. Tradicionalno su oni podijeljeni u proupalne M1, protuupalne M2 i imunosupresivne ili regulacijske makrofage. Smatra se da makrofazi tipa M1, koje induciraju interferon gama (IFN- γ), lipopolisaharid (LPS), i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α , prema engl. *tumor necrosis factor alpha*), a koji proizvode proupalne citokine kao što su TNF- α , interleukin (IL) -6 i IL-1, imaju važnu ulogu u patogenezi kronične upale u jetri, dok makrofazi tipa M2, koje induciraju IL-4, IL-10 i IL-13, a koji proizvode IL-10, transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- β , prema engl. *transforming growth factor β*), trombocitni čimbenik rasta (PDGF, prema engl. *platelet-derived growth factor*) i epidermalni čimbenik rasta (EGF, prema engl. *epidermal growth*

factor) potiču cijeljenje tkiva i stvaranje kolagena. Ovisno o fazi bolesti, u tkivu prevladava jedna od podvrsta makrofaga, M1 ili M2. Xu i suradnici su u svom istraživanju pokazali da je Notch1 signalizacija potrebna za migraciju monocita iz krvi u jetreno tkivo, kao i njihovu diferencijaciju u tip M1. Transgenični miševi kojima je inhibiran Notch1 signalni put u mijeloidnoj lozi su razvijali slabiji upalni odgovor i imali su manje oštećenje jetre u modelima akutnog steatohepatitisa i akutne upale izazvane primjenom LPS-a i d-galaktozamina (6). U zdravom tkivu stalna regulacija i ravnoteža sinteze i razgradnje izvanstaničnog matriksa od izuzetne su važnosti za homeostazu jetrenog tkiva. Tijekom fibrogeneze dolazi do značajnih promjena u količini, ali i u sastavu izvanstaničnog matriksa. Udio kolagena može postati čak i 10 puta veći nego u zdravoj jetri. U zdravoj jetri se primarno stvara kolagen tipa IV, dok u fibroznoj jetri se dominiraju kolagen tipa I i III. Kolagen tipa IV prisutan je i u bazalnim membranama većih krvnih žila i žučnih vodova, ali ne i u bazalnoj membrani jetrenih sinusoida. Takva građa omogućava učinkovit protok molekula između hepatocita i lumena sinusoida, zahvaljujući postojanju fenestra u endotelnim stanicama jetrenih sinusoida. U fibrotičnoj jetri se, međutim, pojačano odlaže i kolagen tipa IV što dovodi do poremećaja u funkciji jetrenih sinusoida, a serumska koncentracija kolagena tipa IV korelira sa stupnjem bolesti (7).

Jetra na tkivno oštećenje također odgovara angiogenezom, a vidljivo je stvaranje novih krvnih žila i remodeliranje postojećih sinusoida. Progresivno nakupljanje izvanstanične tvari aktivira nekoliko puteva pozitivne povratne sprege koji dalje potiču fibrogenezu. Promjene u membranskim receptorima, prije svega integrinima, uzrokuju aktivaciju i migraciju jetrenih zvjezdolikih stanica (HSC, prema engl. *hepatic stellate cells*). Zatim, aktivacija staničnih metaloproteinaza međustanične tvari (MMP, prema engl. *matrix metalloproteinase*) dovodi do oslobađanja čimbenika koji potiču fibrozu i proliferaciju iz izvanstaničnog prostora. Povećana gustoća međustanične tvari također može dovesti do aktivacije HSC (8).

1.1.1. Podrijetlo jetrenih miofibroblasta u cirozi jetre

Primarni stanični izvor međustanične tvari, kako u zdravoj, tako i u fibroznoj jetri su miofibroblasti pozitivni na alfa aktin glatkog mišića (α SMA, prema engl. *alpha smooth muscle actin*). Studije koje su proučavale stanice koje izražavaju α SMA tijekom razvoja fibroze, potvrdile su da se fibroza može smanjiti ili čak ukloniti modulacijom njihovih signalnih puteva.

Podrijetlo jetrenih miofibroblasta je bilo predmet intenzivnog istraživanja tijekom posljednjih desetljeća, a kao mogući izvori miofibroblasta identificirane su HSC, portalni fibroblasti i progenitori mezenhimskih stanica (9-12). Zanimljivo je da od ovih triju vrsta stanica jedino HSC, za koje se kasnije ispostavilo da su najvažniji izvor miofibroblasta, u mirujućem stanju ne izražavaju biljeg miofibroblasta – α SMA.

Ključne spoznaje su dobivene nakon razvoja tehnologije koja je omogućila selektivno obilježavanje stanica *in vivo* fluorescentnim biljezima i praćenje njihovog potomstva. U ključnom istraživanju Mederacke i sur. koristili su selektivno obilježavanje stanica pozitivnih na lecitin-retinol aciltransferazu (LRAT) te su pokazali da je LRAT u mirovanju izražen isključivo u HSC, a da se nakon izazivanja fibroze u različitim mišjim modelima fluorescentni biljeg poklapa s lokacijom miofibroblasta. Zaključeno je da su HSC dominantni izvor miofibroblasta, a da su sve druge stanice izvor tek manjeg broja miofibroblasta, iako taj omjer može dijelom ovisiti o načinu oštećenja jetre. Primjerice, u modelu podvezivanja zajedničkog žučovoda (BDL, prema engl. *bile duct ligation*) moguća je važnija uloga periportalnih fibroblasta (13). Kao moguće ograničenje u istraživanju Mederackea i suradnika navedeno je da nije isključena mogućnost da se nakon oštećenja jetre mezenhimski progenitori najprije diferenciraju u stanice pozitivne na LRAT, a zatim u miofibroblaste. Ovu mogućnost smo mi odlučili istražiti u prvoj fazi našeg istraživanja selektivnim obilježavanjem stanica pozitivnih na α SMA u mirovanju i praćenjem njihove sudbine nakon izazivanja fibroze jetre.

1.1.2. HSC i njihova uloga u patogenezi jetrene fibroze

HSC pripadaju neparenhimskim jetrenim stanicama te čine oko 15% svih jetrenih stanica, a poznate su još i pod nazivima Itove stanice, lipociti, intersticijske stanice i perisinusoidne stanice. U zdravoj jetri HSC se nalaze u Disseovom prostoru u mirujućem obliku te su specijalizirane za pohranu vitamina A (14). Mirujuće HSC izražavaju adipogene čimbenike transkripcije, kao što su PPAR γ , adiponektinski receptor 1, perilipin 2 (PLIN2/ADFP), C/EBP δ , C/EBP α , C/EBP β , i SREBP-1c (6). Uz to što pohranjuju vitamin A, proizvode i matriks metaloproteinaze (MMP) i tkivni inhibitor metaloproteinaza (TIMP, prema engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) -1, kao i razne citokine i njihove receptore. Također sudjeluju u regulaciji protoka krvi kroz sinusoide.

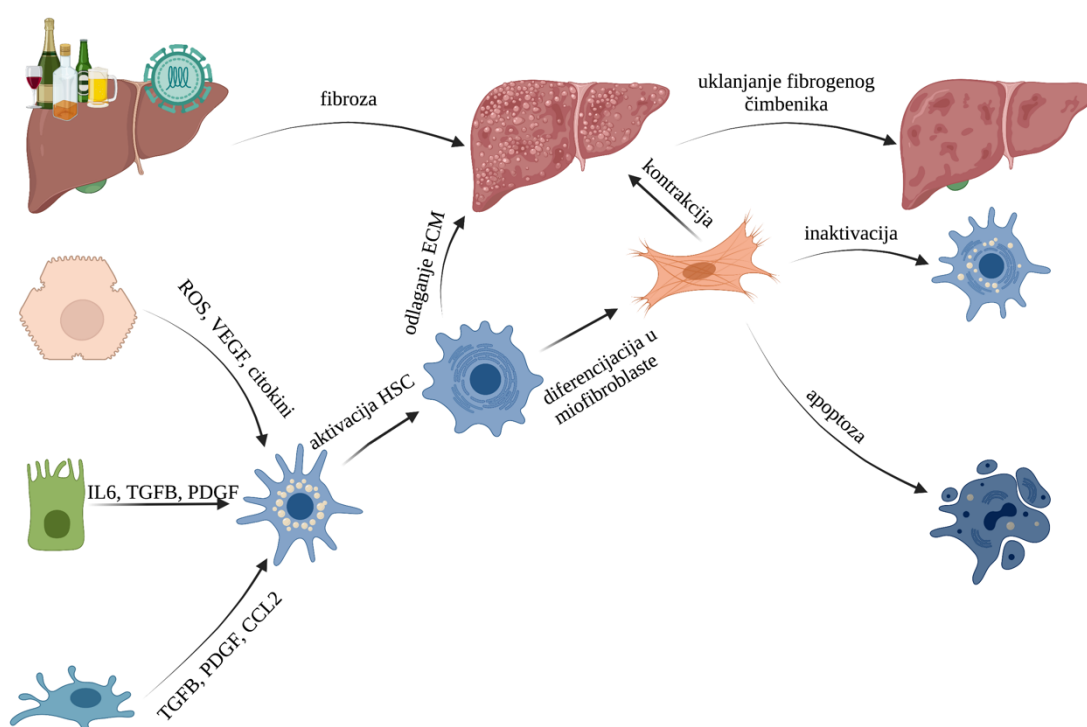
Tijekom razvoja jetre, HSC imaju važne interakcije s hematopoetskim stanicama, bilijarnim epitelnim stanicama, hepatocitima, endotelnim stanicama jetrenih sinusoida (LSEC, prema engl. *liver sinusoidal endothelial cell*), kao i Kupfferovim stanicama (14). Kao odgovor na proupalne signale i signale povezane s oštećenjem jetrenog tkiva, od kojih su najvažniji TGF- β i PDGF, mirujuće HSC se aktiviraju i mijenjaju fenotip. Signali koji moduliraju aktivnost HSC su mnogobrojni, a istraživanja pokazuju da dolaze od drugih jetrenih stanica, kao što su hepatociti, bilijarne epitelne stanice, LSEC, makrofazi, stanice NK i NKT. Neke od njih imaju aktivirajući učinak na HSC, a neke suprimirajući. Važnu ulogu u aktivaciji HSC ima i oksidativni stres. Kao odgovor na oštećenje tkiva, Kupfferove stanice postaju glavni izvor reaktivnih spojeva kisika (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*) koji dalje pridonose aktivaciji HSC i oštećenju, odnosno nekrozi hepatocita (15). Oštećenje hepatocita uzrokuje upalu i fibrozu, a sve je veći broj potencijalnih posrednika aktivacije HSC za koji je pokazano da dolaze iz hepatocita, od liganada signalnog puta *hedgehog*, ROS, nukleotida do molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (DAMP, prema engl. *damage-associated molecular patterns*) koji izlaze iz oštećenih hepatocita.

Jetreni makrofazi, potaknuti najčešće raspadanjem hepatocita, proizvode razne citokine i kemokine koji izravno utječu na aktivaciju HSC. Neki od njih su TGF- β , PDGF, TNF- α , IL-1 β , kemokinski ligand (CCL, prema engl. *chemokine ligand*) 3 i CCL5. TGF- β je najpotentniji poznati čimbenik koji potiče fibrozu. Upalni citokini, kao što su TNF- α i IL-1 β , potiču preživljenje aktiviranih HSC aktivacijom signalnog puta jezgrenog čimbenika κ B (NF- κ B, prema engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). CCL3 je ligand za kemokinski receptor (CCR, prema engl. *chemokine receptor*) -1 i CCR5, čija aktivacija potiče fibrozu, a delecija CCL3 uzrokuje smanjenje fibroze u mišjem modelu potaknutom primjenom CCl₄ (16, 17). Makrofazi su, međutim, važni i u rezoluciji fibroze. Kao izvor metaloproteinaza međustanične tvari (MMP12, MMP13) potiču razgradnju međustanične tvari, a lučenjem MMP9 i TNF-vezanog liganda koji inducira apoptozu (TRAIL prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) potiču apoptozu HSC (16, 18-20). Stanice NK uglavnom pokazuju antifibrotsko djelovanje. One ubijaju aktivirane HSC lučenjem IFN γ , a također potiču njihovu apoptozu izražavanjem čimbenika TRAIL i liganda Fas (FasL, prema engl. *Fas ligand*) na svojoj membrani. Uklanjanjem senescentnih HSC potiču rezoluciju fibroze (16, 21-23).

Aktivirane HSC, za razliku od mirujućih, izražavaju α SMA, proliferiraju, počinju proizvoditi povećane količine međustanične tvari te se diferenciraju u miofibroblaste i stječu svojstvo kontraktilnosti, a gube zalihe vitamina A karakteristične za njihov mirujući oblik (6, 8, 14, 24). HSC također potencijalno imaju i imunološku ulogu pa bi mogle funkcionirati i kao antigen-predodne stanice. Na stimulaciju LPS-om odgovaraju pojačanim izražajem kostimulacijskih molekula (CD80, CD86), kao i molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*) razreda I i II. ROS potiču aktivirane HSC na izlučivanje citokina i kemokina, kao npr. CCL2 putem kojeg se regrutiraju cirkulirajući monociti. Aktivirane HSC također izražavaju nekoliko kemokinskih receptora (CCR5, CXCR7, CXCR3 i CCR7). Ovo svojstvo im omogućuje da migriraju u lokalne limfne čvorove i sudjeluju u edukaciji naivnih limfocita T, gdje ih usmjeravaju u regulacijski fenotip. To može pokrenuti smanjenje ili modulaciju upale jer regulacijski limfociti T potiču smanjeno izražavanje receptora koji aktiviraju stanice NK na membrani HSC. Isto tako, aktivirane HSC pojačano izražavaju molekulu Fas na svojoj membrani, potičući tako apoptozu putem Fas-FasL mehanizma, koji je ovisan o limfocitima T (25).

Prilikom rezolucije fibroze postoji tri načina eliminacije aktiviranih HSC, a to su reverzija u mirujući oblik, apoptoza i senescencija (25-27). U slučaju uklanjanja fibrogenog podražaja, aktivirane HSC mogu se vratiti u svoj mirujući oblik, što su pokazali Troeger i suradnici na mišjem modelu, no isto tako su pokazali i da su te deaktivirane stanice reaktivnije na buduće fibrogene podražaje u usporedbi sa stanicama koje nikada nisu bile aktivirane (26). Slično, Kisseleva i suradnici su pokazali da su inaktivirane HSC fenotipski slične mirujućim HSC, međutim, inaktivirane HSC tretirane čimbenikom TGF- β 1 u kulturi pojačano su izražavale gene specifične za miofibroblaste (lanac alfa 1 kolagena tipa I (*Colla1*, prema engl. *collagen type I alpha 1 chain*), aktin alfa 2 glatkog mišića (*Acta2*, prema engl. *actin alpha 2, smooth muscle*), *Timp1*) u odnosu na mirujuće. Ove rezultate potvrdili su i pokusom *in vivo* gdje su pokazali da miševi koji su se već jednom oporavili od fibroze, razvijaju jaču fibrozu na ponovnu primjenu CCl₄ u odnosu na one koji su njime tretirani prvi put. Također su pokazali i da će inaktivirane HSC doprinijeti fibrozi u miševa u koje su prenesene adoptivnim transferom, dok mirujuće HSC neće (28). Apoptotične aktivirane HSC u kulturi pojačano proizvode MMP-2 i MMP-14, dok indukcija apoptoze aktiviranih HSC gliotoksinom u modelu fibroze izazvanom primjenom CCl₄ dovodi do smanjenja fibroze. U više modela jetrene fibroze primijećeno je da gubitak, odnosno apoptoza aktiviranih HSC dovodi do značajnog smanjenja

aktivnosti TIMP, a do povećanja aktivnosti MMP, što za rezultat ima povećanu razgradnju međustanične tvari (25). Aktivirane HSC koje odlaze putem senescencije pokazuju manje fibrogeni fenotip te su sklone spontanoj apoptozi, a isto tako inducirana senescencija uzrokuje smanjenu fibrogenezu *in vivo*. Takve stanice počinju izražavati ligande za receptore stanica NK, što potiče njihovu eliminaciju. Također, pokazano je da IL-22 potiče senescenciju HSC i time smanjuje fibrozu (29). Ključni događaji u aktivaciji HSC i njihovoj ulozi u razvoju fibroze prikazani su na slici 1.1.



Slika 1.1. Patogeneza jetrene fibroze. Jetrena fibroza javlja se kao odgovor jetrenog tkiva na ozljedu (alkohol, virusni hepatitis, kronična upala). Stanice jetrenog tkiva će na ozljedu reagirati stvaranjem i izlučivanjem upalnih čimbenika i čimbenika koji potiču fibrozu, koji će dovesti do središnjeg događaja u patogenezi jetrene fibroze, aktivacije HSC. HSC na ovaj podražaj reagiraju promjenom fenotipa iz mirujućeg u aktivirani, a tu promjenu karakterizira gubitak vitamina A uskladištenog u citoplazmi te pojačana sinteza i odlaganje proteina međustanične tvari, kao i izlučivanje upalnih citokina, a diferencijacijom u miofibroblaste stječu i svojstvo kontraktilnosti. Uklanjanjem čimbenika koji potiču fibrozu (prestanak konzumiranja alkohola, izlječenje virusnog hepatitisa) počinje proces cijeljenja tkiva, a HSC se uklanjaju apoptozom, inaktiviraju se ili odlaze putem senescencije. ROS – reaktivne kisikove skupine, VEGF – čimbenik rasta krvožilnog endotela, IL6 – interleukin 6, TGFB – transformirajući čimbenik rasta beta, PDGF – trombocitni čimbenik rasta, CCL2 – kemokinski ligand s C-C motivom 2, HSC – HSC, ECM – međustanična tvar. Shema kreirana na BioRender.com

1.2. Životinjski modeli jetrene fibroze

S obzirom na to da je jetrena fibroza složen proces koji uključuje više vrsta stanica, kao i brojne molekularne posrednike, modeli *in vitro* nisu dovoljni kako bi vjerodostojno prikazali njenu patogenezu. Isto tako, fibroza se razvija kao odgovor na više različitih etioloških čimbenika pa jedan životinjski model ne bi bio dovoljan za proučavanje svih potencijalnih etiopatogenetskih mehanizama. Stoga su razvijeni brojni modeli *in vivo* jetrene fibroze koji odražavaju različite etiopatogenetske mehanizme koje fibroze. Ugrubo ih se može podijeliti u pet različitih kategorija pa tako postoje modeli temeljeni na primjeni određenih kemijskih spojeva, modeli temeljeni na specifičnim načinima prehrane, kirurški modeli, modeli temeljeni na genetski modificiranim životinjama i infektivni modeli.

U modele temeljene na primjeni određenih kemijskih spojeva mogu se ubrojiti modeli oštećenja jetre izazvani primjenom etanola, CCl₄, tioacetamida, dimetilnitrozamina i dietilnitrozamina. Ovi modeli su vrlo popularni zbog njihove jednostavnosti, ponovljivosti i zbog toga što prikladno odražavaju patogenetske mehanizme uključene u razvoj ljudske jetrene fibroze. Prehrambeni modeli koriste se za proučavanje nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD, prema engl. *non-alcoholic fatty liver disease*) i nealkoholnog steatohepatitisa (NASH, prema engl. *non-alcoholic steatohepatitis*). U njih spadaju dijeta siromašna metioninom i kolinom, prehrana bogata mastima i prehrana s nedostatkom kolina i definiranim sadržajem aminokiselina (prema engl. *choline-deficient L-amino acid defined diet*). Problem s ovim modelima u miša je što je razvoj fibroze ovisan o soju koji se koristi za pokus te što ne prikazuju vjerno mehanizme koje nalazimo u ljudi pa je tako njihova primjena i ekstrapolacija mišjih nalaza na ljude ograničena. BDL predstavlja kirurški model izazivanja fibroze te je koristan za kratkoročno proučavanje fibroze izazvane kolestatskim ozljedama jetre. Ograničenje mu uglavnom predstavlja perioperativna smrtnost i nekonzistentni odgovor jetrenog tkiva uzrokovan različitom prilagodbom žučnog mjehura. Modeli na transgeničnim životinjama postali su izrazito važan alat u proučavanju fibroze jer omogućavaju uvid u ulogu pojedinih proteina ili signalnih puteva u njenom razvoju. Ti modeli rijetko razvijaju fibrozu samo zbog svojih genetskih modifikacija pa im je potreban dodatni stimulans, npr. CCl₄, što odražava važnost interakcije gena i okolišnih čimbenika u razvoju fibroze. Infektivni modeli pomažu u identifikaciji uloge imunološkog sustava u patogenezi fibroze, u čemu drugi modeli nisu uspješni, a model infekcije virusom hepatitisa B pokazao je važnost imunoloških reakcija za progresiju jetrene bolesti u hepatocelularni karcinom (13, 30).

1.2.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl₄

CCl₄ je najčešće korišteni hepatotoksin u proučavanju jetrene fibroze u modelima na glodavcima. Dolaskom u jetru, CCl₄ se putem citokroma p450 2E1 (CYP2E1, prema engl. *cytochrome p450 2E1*) metabolizira u triklorometilni radikal koji sudjelovanjem u reakcijama lipidne peroksidacije doprinosi akutnoj reakciji koju karakterizira nekroza centrilobularnih hepatocita, aktivacija Kupfferovih stanica i upala (13). Podložnost miševa fibrozi uzrokovanoj primjenom CCl₄ ovisna je o soju, a najpodložniji je soj BALB/c (31). Najčešći put primjene je intraperitonejski, a standardna doza iznosi 0,5 do 1,0 µL/g tjelesne mase dva ili tri puta tjedno tijekom nekoliko tjedana (32). Drugi putevi primjene su također istraživani, ali nose svoje komplikacije pa tako primjena oralnom gavažom nosi veću smrtnost životinja, subkutana primjena dovodi do stvaranja granuloma na mjestu primjene, a inhalacija zahtijeva prikladnu opremu i osposobljavanje operatera (13). Usporedba podložnosti različitih sojeva fibrozi izazvanoj primjenom CCl₄ pokazala je da ne samo da su različiti sojevi u različitoj mjeri podložni razvoju fibroze, nego i da isti soj može razviti različit stupanj fibroze u ovisnosti o putu primjene. Istraživanje koje su proveli Shi i suradnici pokazalo je da je soj C57BL/6 otporan na fibrozu ukoliko se CCl₄ primijeni oralnom gavažom, ali su Hillebrandt i suradnici pokazali da će isti taj soj razviti umjereno jaku fibrozu ako se CCl₄ primijeni intraperitonejski (33, 34).

1.2.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidina

Hranjenje miševa hranom s dodanim 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidinom (DDC prema engl. *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*) dovodi do ozljede jetre i bilijarnog sustava te posljedično bilijarne fibroze. Takva prehrana dovodi do indukcije reaktivnog fenotipa bilijarnih epitelnih stanica koje pojačano izražavaju upalne i fibrogene čimbenike te adhezijske molekule (vaskularna stanična adhezijska molekula (VCAM, prema engl. *vascular cellular adhesion molecule*), TNF-α, osteopontin, PDGF, CCL2, TGF-β), što za posljedicu ima neutrofilnu infiltraciju, odnosno perikolangitis. Neutrofilna infiltracija se pojačava s trajanjem prehrane s dodatkom DDC-a. Aktivacija i oštećenje bilijarnih epitelnih stanica dovode do duktularne reakcije, koja potiče stvaranje portalno-portalnih septa. Aktivacija i proliferacija

periduktalnih miofibroblasta dovodi do povećanog stvaranja međustanične tvari i posljedično sklerozirajućeg kolangitisa. Pojačano lučenje porfirina u lumen žučnih kanalića dovodi do stvaranja čepova, što dalje potiče razvoj sklerozirajućeg kolangitisa i bilijarne fibroze. U životinja kojima se prehrana s dodatkom DDC-a prekine, smanjuje se izražavanje upalnih i fibrogenih čimbenika tijekom oporavka od strane bilijarnih epitelних stanica, zbog čega se pretpostavlja da je u ovom modelu fibroze aktivacija bilijarnih epitelnih stanica i njihovo oštećenje ključan korak u razvoju fibroze. Standardno se miševima daje hrana s 0,1% DDC-a u trajanju od 4 tjedna tijekom kojih miševi imaju pristup hrani *ad libitum* (30).

1.2.3. Uporaba transgeničnih miševa u selektivnom praćenju HSC i funkcionalnim istraživanjima

Genetski modificirani miševi često se koriste u proučavanju ljudskih bolesti zbog sličnosti u patofiziološkim mehanizmima. Od posebnog značaja je Cre-*loxP* sustav, koji znanstvenicima omogućava proučavanje uloge gena u specifičnim stanicama ili tkivima, kao i u određenom vremenskom periodu. Cre-*loxP* sustav se sastoji od rekombinaze Cre koja prepoznaje specifične odsječke DNA, *loxP* (prema engl. *locus of x-over, PI*) te posreduje deleciju DNA sekvence koja se nalazi između dva odsječka *loxP*. Miševi s ovim svojstvima generiraju se križanjem soja koji sadrži rekombinazu Cre sa sojem u kojeg je odsječak DNA od interesa omeđen sekvencama *loxP*. Specifičnost i trenutak rekombinacije kontrolirani su promotorom ili pojačivačem (35, 36, 37).

Kako bi proučavanje uloge gena u određenim stanicama, tkivu ili u određenom stadiju razvoja bilo točnije, razvijeni su i modeli inducibilne rekombinaze Cre, u kojima ona nije konstitucijski aktivna, nego ju aktivira primjena egzogenog induktora, kao što su tamoksifen ili tetraciklin. Sustav Cre induciran tamoksifenom generira se spajanjem modificiranog proteina Cre s estrogenskim receptorom koji sadrži mutiranu domenu na koju se veže ligand. Novi protein nazvan je rekombinaza CreER, tamoksifen (CreERT) te se normalno nalazi u citoplazmi stanice vezan za proteine toplinskog šoka (HSP90, prema engl. *heat shock protein 90*). Vezanjem tamoksifena, prekida se interakcija između HSP90 i CreERT, što uzrokuje translokaciju CreERT u jezgru gdje rekombinaza Cre može djelovati na odsječak DNA koji se nalazi između dva *loxP* odsječka. Tamoksifen se standardno primjenjuje intraperitonejskom injekcijom (35, 38, 39). Zbog velike vrijednosti Cre-*loxP* sustava, razvijeni su brojni mišji

sojevi s Cre rekombinazom specifičnom za određeni organ ili određenu staničnu liniju. S obzirom na to da HSC imaju svoj mirujući i aktivirani fenotip, a oni se međusobno razlikuju u genima i proteinima koje izražavaju, bilo je potrebno razviti više modela kako bi se one mogle učinkovito proučavati. Model specifičan za mirujuće HSC je LRATCre. LRAT kao promotor je izabran zbog njegove visoke izraženosti u HSC, a isto tako je gotovo u potpunosti odsutan u hepatocitima, Kupfferovim stanicama i kolangiocitima. Za proučavanje aktiviranih HSC, kao promotori su dostupni vimentin i α SMA. Vimentin je intermedijarni filament kojeg izražavaju stanice mezenhinskog podrijetla, a posebno miofibroblasti, dok α SMA izražavaju dominantno stanice glatkog mišića, periciti i miofibroblasti. S obzirom na to da se aktivirane HSC diferenciraju u miofibroblaste, ova dva promotora su prikladna za njihovo praćenje (11, 26, 28, 39).

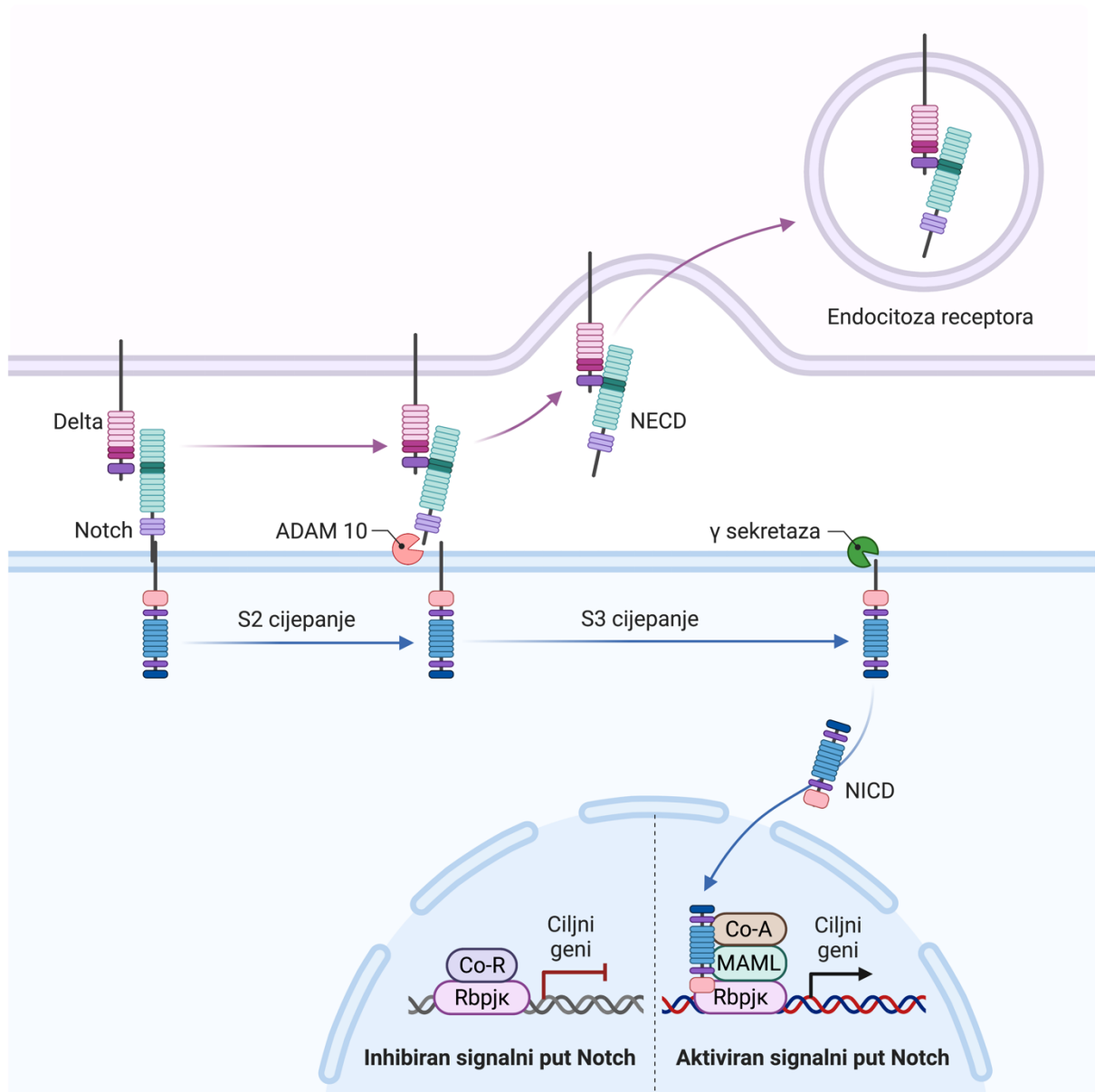
1.3. Signalni put Notch

Signalni put Notch visoko je očuvani signalni mehanizam, prvi put otkriven u vinskoj mušici, *D. melanogaster*. Interakcije između receptora i liganada uključenih u ovaj signalni put događaju se jukstakrino, što znači da se ligand na membrani jedne stanice veže za receptor na susjednoj stanici, čime se pokreće slijed nizvodnih reakcija koje dovode do pojačane ekspresije gena vezanih uz Notch (40, 41). U sisavaca postoje 4 Notch receptora, Notch1-4 te 5 liganada, DLL (prema engl. *delta-like ligand*)1, 3 i 4 te JAG (prema engl. *jagged*)1 i 2 koji sudjeluju u kanonskom signalnom putu Notch. Ligandi signalnog puta Notch imaju brojne uloge. DLL1 upravlja međustaničnom komunikacijom i staničnom diferencijacijom, DLL3 suprimira stanični rast tako što inducira apoptozu, DLL4 aktivira signalizaciju posredovanu NF- κ B, čime pojačava sekreciju VEGF-a i metastaziranje tumora, JAG1 pojačava angiogenezu, a JAG2 potiče preživljenje stanica i njihovu proliferaciju.

Receptor Notch je transmembranski protein. Nastaje u endoplazmatskoj mrežici stanice koja prima signal, a zatim se transportira u Golgijev aparat, gdje se cijepa u heterodimere (S1 cijepanje), nakon čega se transportira na membranu. Izvanstanična domena sadrži 29 do 36 ponavljajućih sljedova sličnih epidermalnom čimbeniku rasta (prema engl. *EGF-like – epidermal growth factor-like*), nakon kojih slijedi negativna regulacijska regija (NRR) koja sprječava aktivaciju receptora u odsustvu liganada. NRR na svoju heterodimerizacijsku domenu (HD) veže unutarstaničnu domenu receptora (NICD – prema engl. *Notch intracellular domain*).

Većina liganada su također transmembranski proteini, a karakterizira ih slijed tri povezana strukturna motiva, N-terminalni DSL (Delta/Serrate/LAG-2) motiv, DOS domena (prema engl. *Delta and OSM-11-like proteins*) i ponavljajući EGF-like motiv. U stanici koja šalje signal, ligandi signalnog puta Notch raspodijeljeni su na membrani gdje mogu vezati receptor. Međutim, ligandi nisu aktivni sve do ubikvitinilacije koju provode Neur (Neuralized) ili Mib (Mindbomb). Aktivacija receptora Notch posredovana je nizom proteoliza. Vezanje liganda za receptor dovodi do cijepanja receptora putem metaloproteinaze ADAM (S2 cijepanje). Ostatak receptora, nazvan NEXT (prema engl. *Notch extracellular truncation*), sastoji se od transmembranske i unutarstanične domene. NEXT zatim postaje supstrat enzima γ -sekretaze (S3 cijepanje), čijim djelovanjem se oslobađa NICD, koja potom odlazi u jezgru. NICD u jezgri veže protein Rbpjk (poznat i kao CSL) i MAML (prema engl. *mastermind-like*), što dovodi do otpuštanja korepresora i poticanja koaktivatora koji dovode do prepisivanja ciljnih gena. Ciljni geni kanonskog signalnog puta Notch su HES (prema engl. *Hairy/Enhancer of Split*) i HEY (prema engl. *Heiry/Enhancer of Split related to YRPW motif*).

Navedeni slijed događaja naziva se kanonski signalni put Notch, ali postoje i alternativni načini aktivacije receptora Notch koji se skupa nazivaju nekanonski signalni put Notch (40-42). U jednom od nekanonskih puteva aktivacije signalnog puta Notch, NICD ostaje u citoplazmi stanice, gdje reagira s drugim signalnim putevima, kao što su NF- κ B, mTORC2, AKT i Wnt. Interakcija između NICD i NF- κ B djeluje na maligna svojstva stanica karcinoma vrata maternice, kolorektalnog karcinoma, karcinoma dojke i karcinoma pluća malih stanica. Nadalje, u jednom od nekanonskih signalnih puteva, receptor Notch se endocitozom prenosi u endosom, odakle se može vratiti na membranu, razgraditi u lizosomu ili aktivirati u endosomu, što se naziva aktivacija neovisna o ligandu. Ovakva aktivacija signalnog puta Notch ključna je za razvoj limfocita T u timusu. Ovi nekanonski mehanizmi pridonose raznolikosti učinaka signalnog puta Notch i povećavaju njegovu složenost (42). Glavni događaji priključkom aktivacije Notch receptora su prikazani na slici 1.2.



Slika 1.2. Shema signalnog puta Notch. Interakcija receptora i liganda na susjednim stanicama. Notch unutarstanična domena se odvaja proteolizom od ostatka receptora te odlazi u jezgru gdje skupa s proteinima Rbpjk i MAML potiče transkripciju ciljnih gena. NECD – Notch izvanstanična domena, NICD – Notch unutarstanična domena, Rbpjk – represor transkripcije ciljnih gena, MAML – Mastermind-like. Shema kreirana na BioRender.com

1.3.1. Uloga signalnog puta Notch u razvoju tkiva i organa

Signalni put Notch ima ulogu u razvoju brojnih tkiva i organa. S obzirom na to da je ovaj signalni put visoko očuvan, njegova deficijencija dovodi do letaliteta u embrionalnom razvoju tijekom kojeg je izrazito aktivan, dok u zrelih tkivima održava nisku razinu aktivnosti. Također, pojačano je aktivan u stanjima ozljede i stresa, te je od velike važnosti za razvoj tkiva, kao i popravak ozljede (42). Njegova uloga se očituje na dva načina; u prvom on blokira diferencijaciju stanica određene linije pa time osigurava stalnu zalihu matičnih ili prethodničkih stanica, dok u drugom usmjerava stanicu u jedan od više mogućih puteva diferencijacije te time osigurava ravnotežu između pojedinih puteva. U nekim slučajevima, primjerice u koži, Notch potiče diferencijaciju matičnih stanica epidermisa (40, 41). Signalni put Notch važan je za razvoj organa koji nastaju iz somita: dermisa, kostiju i skeletnih mišića trupa. Smatra se da je za njihov razvoj bitno oscilirajuće izražavanje gena, između ostalih i onih iz signalnih puteva Wnt i Notch. Signalni put Notch regulira i inhibira stvaranje osteoblasta, hondrocita i osteoklasta različitim ligandima i receptorima (NOTCH1, NOTCH2, JAG1, DLL1), ali i nizvodnim genima (*Sox9*, prema engl. *SRY-related high-mobility group box 9*). U mišjem modelu stoga nedostatak signalnog puta Notch dovodi do deplecije multipotentnih prethodničkih stanica i izostanka cijeljenja prijeloma. Međutim, povremena i privremena upotreba inhibitora γ -sekretaze potiče stvaranje kalusa, kao i veću čvrstoću, što znači da signalni put Notch iskazuje svoju funkciju vremenski i prostorno uvjetovano. Također, Notch regulira nekoliko koraka u razvoju krvnih žila, u kojima potiče diferencijaciju endotelnih stanica te ima važnu ulogu u ranoj organizaciji krvnih žila u arterije i vene, gdje zajedno s VEGF i Wnt signalizacijom potiče razvoj arterija. *Hey1* i *Hey2* važni su za diferencijaciju endokarda, dok progenitorske stanice miokarda izražavaju Notch1 u velikim količinama. U miševa kojima je isključen gen za *Rbpjk* dolazi do aberantnog razvoja koronarnih krvnih žila. Inhibicija signalnog puta Notch u stanicama neuralnog grebena, posebice NOTCH2 i NOTCH3, dovodi do vaskularne displazije, defekata aorte pa čak i krvarenja.

Aktivnost Notch1 je pojačana u hematopoetskim stanicama, dok one hematopoetske stanice u kojima je Notch1 isključen ne sudjeluju u hematopoezi. Također, signalni put Notch ima ulogu u osiguravanju optimalnog broja hematopoetskih matičnih stanica u fetalnoj jetri, no nije jasno je li on potreban i za održavanje tih stanica u odraslog čovjeka. U hematopoetskim stanicama najbolje je opisana uloga signalnog puta Notch u sazrijevanju limfocita T. Inaktivacija *Notch1*

ili *Rbpjk* u ranim hematopoetskim stanicama dovodi do zastoja u razvoju limfocita T u timusu te se umjesto njih razvijaju limfociti B. Isto tako, pojačana aktivnost navedena dva gena dovodi do pojačanog stvaranja limfocita T, a smanjenog stvaranja limfocita B (42). U razvoju središnjeg živčanog sustava, signalni put Notch također ima ulogu u održavanju potrebnog broja matičnih ili prethodničkih stanica tako što inhibira diferencijaciju u neurone. Pretpostavlja se da se selekcija ranih neurona iz progenitorskih stanica odvija putem procesa lateralne inhibicije, pri čemu JAG1 i DLL1 izraženi na stanici koja se razvija u smjeru neurona sprječavaju okolne stanice u tome da i one postanu neuroni. Signalni put Notch važan je i za diferencijaciju svih podtipova glija stanica, osim oligodendrocita. Njegov nedostatak inducira diferencijaciju matičnih stanica u smjeru neurona na račun diferencijacije u glija stanice. U kasnijim stadijima razvoja, Notch mijenja svoju ulogu i umjesto inhibicijske, ima promovirajuću ulogu u stvaranju i diferencijaciji astrocita (40, 41).

1.3.2. Signalni put Notch u razvoju i bolestima jetre

Jetrene matične stanice, hepatoblasti, diferenciraju se u dvije glavne stanične loze, hepatocite i kolangiocyte. Diferencijaciju hepatoblasta kontroliraju signalni putevi Notch, TGF- β i Wnt. Aktivacija signalnog puta Notch u ranim stadijima razvoja jetre pozitivno je regulirana signalnim putem receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR prema engl. *epidermal growth factor receptor*) gdje ona potiče razvoj žučnih vodova. Iako je ukupni učinak signalnog puta Notch poticanje diferencijacije u kolangiocyte, učinci pojedinačnih receptora mogu imati različitu ulogu pa se tako stanice koje izražavaju NOTCH3 ipak usmjeravaju u hepatocite. Također, podatci dobiveni studijama u kojima je rađena inaktivacija pojedinačnih Notch receptora idu u prilog tome da različiti receptori imaju i različite funkcije pa tako inaktivacija receptora NOTCH2, ali ne i NOTCH1 dovodi do smanjenog razvoja žučnih vodova u miševa. Mutacije *Jag1* i *Notch2* u sindromu Alagille također dovode do sličnog fenotipa u ljudi, smanjenog broja žučnih vodova, što govori u prilog tome da signalni put Notch igra važnu ulogu u poticanju razvoja kolangiocita. Mišji model s dvostrukom mutacijom (*Notch2*, *Jag1*) razvija istu histološku sliku malobrojnih žučnih vodova koja se javlja u ljudi oboljelih od ovog sindroma (43, 44). Također, pokusi *in vivo* i *in vitro* koje su proveli Hofmann i sur. (43), Tanimizu i Miyajima (45), Zong i sur. (47) te Fiorotto i sur. (47) pokazali su da modulacija signalnog puta Notch u periportalnoj regiji utječe na razvoj i diferencijaciju žučnih vodova.

Uloga signalnog puta Notch u procesu regeneracije jetre predmet je brojnih istraživanja. U modelu eksperimentalne hepatektomije u štakora pronađena je pojačana ekspresija Notch1 i Jag1 što znači da bi Notch mogao imati ulogu u procesu cijeljenja. Važan odgovor tkiva na ozljedu čini i duktularna reakcija (povećan broj kanalića u bilijarnom sustavu) te su određena istraživanja pokazala da aktivacija signalnog puta Notch sprječava širenje duktularne reakcije. Pokusi na miševima koji su uključivali DDC model pokazali su smanjen broj jetrenih prethodničkih stanica kao i smanjenu duktularnu reakciju kada je signalni put Notch inhibiran, a u miševima s jetrenospecifičnom ablacijom *Notch2* ili *Rbpjk* dovodi do smanjenog broja zrelih kanalića (41, 46). Sve je više spoznaja kako mutacije i disregulacija u signalnom putu Notch imaju ulogu i u razvoju brojnih tumora. S obzirom na važnost u razvoju i diferencijaciji kolangiocita, proučavana je njegova uloga u razvoju kolangiokarcinoma te je primijećeno da je u bolesnika koji boluju od kolangiokarcinoma, kao i u mišjem modelu kolangiokarcinoma *Notch3* pojačano izražen. Uloga signalnog puta Notch u razvoju hepatocelularnog karcinoma još nije razjašnjena i predmet je istraživanja (40, 41).

Iz navedenog je vidljivo da signalni put Notch ima važnu ulogu u normalnom razvoju jetre i žučnih vodova, ali njegova uloga u postnatalnom životu, kao i u patogenezi jetrene fibroze nije do kraja razjašnjena. Dosadašnja istraživanja pokazala su da modulacija signalnog puta Notch može utjecati na razvoj fibroze. Nekoliko istraživanja pokazalo je da inhibicija signalnog puta Notch može smanjiti razvoj fibroze, kao i da njegova forsirana aktivacija dovodi do njenog opsežnijeg razvoja. Nedostatak istraživanja koje je proučavalo inhibiciju signalnog puta Notch je u tome što su za inhibiciju korišteni inhibitori γ -sekretaze koji neselektivno inhibiraju sve signalne puteve nizvodno od tog enzima (1). Istraživanje koje su proveli Zhu i sur. pokazalo je da forsirana aktivacija signalnog puta Notch1 u hepatocitima dovodi do opsežnije fibroze u odnosu na kontrolu (48). Navedena istraživanja koja uključuju inhibiciju γ -sekretaze nisu dovoljno selektivna da bi se moglo utvrditi je li učinak inhibicije signalnog puta Notch posredovan inhibicijom HSC ili su možda u pitanju hepatociti ili Kupfferove stanice koje također izražavaju receptore i ligande signalnog puta Notch, dok je istraživanje koje je uključivalo aktivaciju signalnog puta Notch1 bilo usmjereno na hepatocite. Stoga smo odlučili napraviti istraživanje koje će biti usmjereno na aktivirane HSC, kao glavni izvor miofibroblasta i kolagena u jetrenoj fibrozi te istražiti na koji način modulacija signalnog puta Notch (njegova inhibicija i aktivacija) utječu na razvoj jetrene fibroze.

2. Hipoteza

Aktivacija signalnog puta Notch u stanicama koje izražavaju α SMA potiče, a inhibicija koči razvoj jetrene fibroze izazvane primjenom ugljikovog tetraklorida (CCl_4) ili prehranom obogaćenom 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidinom (DDC).

3. Ciljevi istraživanja

3.1. Opći cilj

Opći cilj doktorskog rada je istražiti učinak modulacije signalnog puta Notch u stanicama koje izražavaju α SMA na razvoj jetrene fibroze izazvane primjenom CCl₄ ili prehranom obogaćenom spojem DDC.

3.2. Specifični ciljevi

1. U mišjem soju C57BL/6 istražiti izraženost gena povezanih s aktivnošću signalnog puta Notch bazalno i tijekom razvoja fibroze u jetrenom tkivu i izoliranim jetrenim zvjezdolikim stanicama.
2. Primjenom tamoksifena u različitim vremenskim točkama u soju transgeničnih miševa SMACreERT2/Ai9 istražiti diferenciraju li se stanice koje su bazalno pozitivne na α SMA (mezenhimski progenitori i prerivaskularne stanice glatkog mišića) u miofibroblaste tijekom razvoja fibroze ili je to svojstvo samo aktiviranih zvjezdolikih stanica.
3. Istražiti ulogu inaktivacije ključnog transkripcijskog čimbenika signalnog puta Notch, Rbpjk (transgenični soj SMACreERT2/RBP-J^{fl/fl}) u stanicama pozitivnim na α SMA u razvoju jetrene fibroze u dva mišja modela jetrene fibroze (toksičnom modelu izazvanom CCl₄ i kolestatskom modelu izazvanom prehranom obogaćenom spojem DDC).
4. Istražiti ulogu pojačanog izražavanja gena *Notch1* (transgenični soj SMACreERT2/Rosa^{NICD1}) u stanicama pozitivnim na α SMA u razvoju fibroze, koristeći navedena dva mišja modela jetrene fibroze.

4. Materijali i metode

Pokusi su izvedeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije: CCl₄ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), DDC, DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), hidroksitamoksifen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), ketamin (Richter Pharma AG, Wels, Austrija), ksilazin (Alfasan International, Woerden, Nizozemska), kukuruzno ulje (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), penicilin/streptomycin (PenStrep Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), tamoksifen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), TRI Reagent (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.1. Plan istraživanja

Istraživanje je provedeno u pet faza. U prvoj fazi jetrena fibroza izazvana je u miševa soja C57BL/6 primjenom 2 modela, injiciranje CCl₄ i prehrana s dodatkom spoja DDC. Životinje su žrtvovane nakon 2 tjedna (oba modela), te nakon 4 (samo DDC) i 6 (samo CCl₄) tjedana. U svakoj vremenskoj točki uzeti su uzorci seruma za određivanje koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST), po jedan uzorak jetrenog tkiva za histološku analizu, izolaciju RNA i analizu metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) te određivanje udjela hidroksiprolina. Također su izolirane HSC za analizu metodom qPCR i protočnociometrijsku analizu. U drugoj fazi istraživanja jetrena fibroza izazvana je kod miševa soja SMACreERT2/Ai9. Primjenom tamoksifena stanice koje su pozitivne na α SMA počinju izražavati fluorescentni biljeg te su praćene tijekom procesa fibrogeneze. Miševima koji su tretirani tamoksifenom prije započinjanja tretmana CCl₄ odnosno spojem DDC označene su populacije stanica koje bazalno izražavaju α SMA (mezenhimski progenitori i prerivaskularne stanice glatkog mišića), a miševima koji su tretirani tamoksifenom nakon započinjanja tretmana CCl₄ odnosno spojem DDC označene su i stanice koje bazalno izražavaju α SMA i aktivirane HSC. Uzeti su uzorci jetrenog tkiva te je imunohistokemijski određen doprinos različitih populacija stanica pozitivnih na α SMA ukupnom broju miofibroblasta. U trećoj fazi korišteni su miševi soja SMACreERT2/RBP-J^{fl/fl} u kojima je primjenom tamoksifena signalni put Notch inhibiran specifično u stanicama pozitivnim na α SMA te je histološki, imunohistokemijski i metodom qPCR procijenjena uloga njegove

inhibicije u nastanku fibroze. U četvrtoj fazi korišteni su miševi soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} u kojima je primjenom tamoksifena signalni put Notch aktiviran specifično u stanicama pozitivnim na α SMA te je histološki, imunohistokemijski i metodom qPCR procijenjena njegova uloga u nastanku fibroze. U petoj fazi istraživanja korišteni su miševi soja C57BL/6 na kojima je u modelu prehrane s dodatkom spoja DDC ispitivan učinak tamoksifena na razvoj jetrene fibroze.

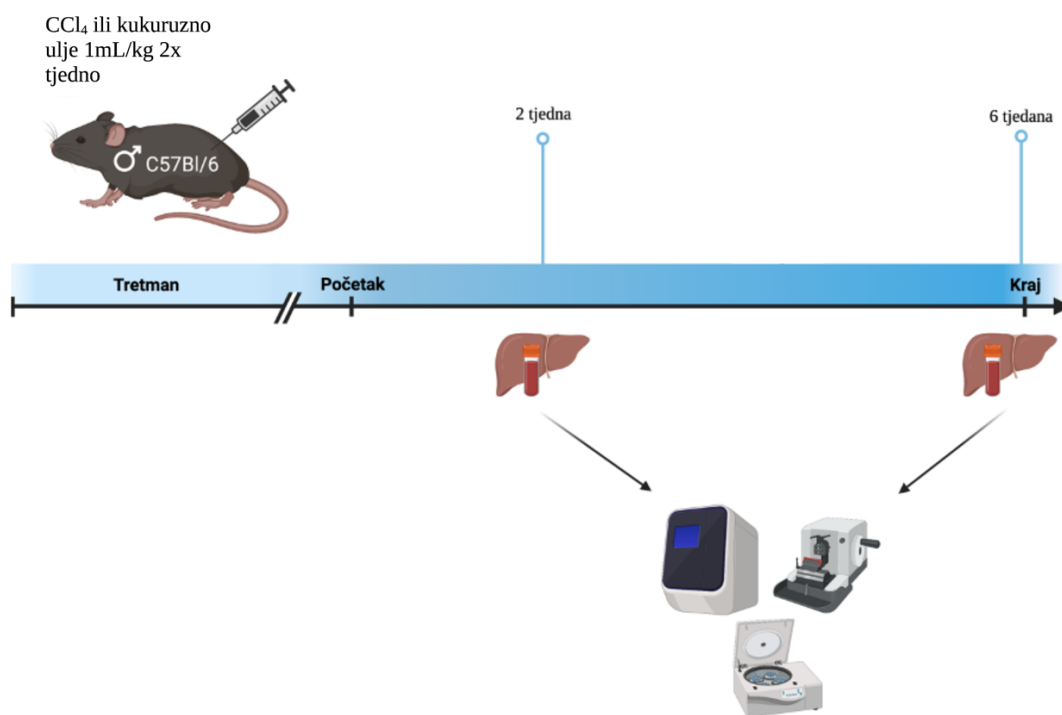
4.2. Pokusne životinje

Za pokuse su korišteni miševi sojeva C57BL/6, Tg(*Acta2-cre/ERT2*)*Ilkal* (u daljnjem tekstu SMACreERT2), B6.Cg-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}/J (dostupni u *The Jackson Laboratory*, broj soja 007909; u daljnjem tekstu Ai9), *Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(Notch1)Dam}/J (dostupni u *The Jackson Laboratory* broj soja 008159; u daljnjem tekstu Rosa^{NICD1})i Rbpj^{tm1Hon} (darovao prof. Tasuku Honjo, Sveučilište u Kyotu; u daljnjem tekstu RBP-J^{fl/fl}) iz istog legla, u dobi od 6 do 8 tjedana, podijeljeni u pokusnu i kontrolnu skupinu, uz dnevnu regulaciju ciklusa svjetla (10 sati svjetla i 14 sati tame), temperaturu prostorije od 23°C i vlažnost zraka od 50-60%, sterilizaciju kaveza i stelje te standardnu prehranu (4RF25 i 4RF21; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i slobodan pristup vodi. Broj životinja po skupini procijenjen je na temelju dosadašnjih pokusa u našem laboratoriju i prikladne literature, uporabom programa G-power, postavljanjem snage studije na 80%, i greške tipa 1 na 5%. Svi postupci provedeni su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (Narodne novine, broj 135/06 i 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (Narodne novine, broj 55/13). Postupci su odobreni od Ministarstva poljoprivrede i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga Notch signalnog puta u patogenezi jetrene fibroze“, a izvodili su ih za to osposobljeni istraživači. Za anesteziju i analgeziju kod bolnih postupaka korištena je se kombinacija ketamina i ksilazina (200 mg/kg i.p. ketamina i 16 mg/kg i.p. ksilazina). Miševi su žrtvovani u nekoliko vremenskih točaka tijekom protokola te su uzeti uzorci za analizu. Ukupno je korišteno između 310 i 330 miševa, svaki set pokusa ponovljen je tri puta, a postupak izazivanja fibroze je umjereno težak pokus. Pri planiranju pokusa uvijek je vođeno računa o načelima 3R (prema engl. *reduction, replacement, refinement* – smanjenje broja životinja, zamjena životinja, poboljšanje modela). Preciznom aplikacijom i korištenjem jednakog broja životinja iz istog legla (iste dobi i spola)

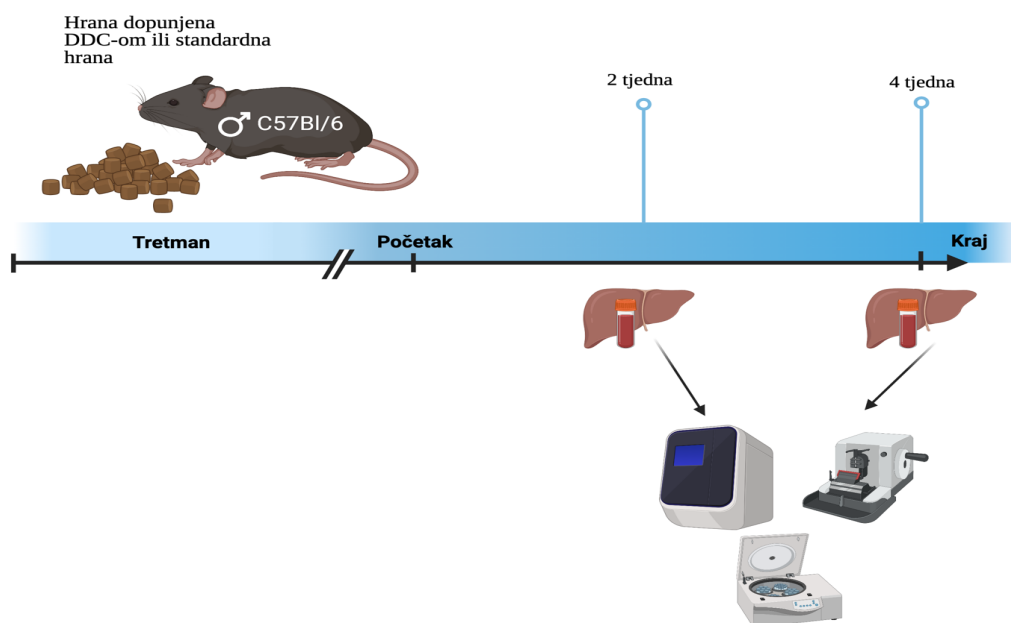
u kontrolnoj i pokusnoj skupini smanjena je standardna devijacija unutar skupine, što je omogućilo da se jednaka snaga studije postigne s manjim brojem životinja (*reduction*). Životinje koje su korištene u pokusu svakodnevno su nadzirane te je u slučaju pojave znakova narušenog zdravlja konzultiran veterinar, a životinjama su hrana i voda stavljene na dno kaveza. U slučaju pojave znakova prevelike boli i patnje životinje su eutanizirane (*humane endpoint*). U kavezima su redovito korištena sredstva za obogaćivanje okoliša (*refinement*). Fibroza je složeni proces u čijoj patogenezi naglašenu ulogu imaju interakcije velikog broja stanica i topljivih posrednika pa u ovom slučaju zamjena pokusa *in vitro* metodama nije moguća.

4.2.1. Prva faza istraživanja

U prvoj fazi istraživanja korišteni su miševi soja C57BL/6 kako bismo uspostavili protokol izazivanja fibroze korištenjem CCl₄ i DDC. U modelu s CCl₄ (Slika 4.1) životinje su tretirane s CCl₄ razrijeđenim u kukuruznom ulju u omjeru 1:3 (1,0 mL/kg, 2x tjedno, i.p.) dok je kontrolna skupina primila kukuruzno ulje. Životinje su žrtvovane nakon 2 i 6 tjedana te su uzeti uzorci za histologiju, izolaciju RNA i analizu aktivnosti aminotransferaza. U modelu DDC, pokusna skupina hranjena je standardnom laboratorijskom hranom obogaćenom s 0,025% spoja DDC, a kontrolna skupina hranjena je standardnom laboratorijskom hranom. Životinje su žrtvovane nakon 2 i 4 tjedna te su uzeti isti materijali za analizu kao u prethodnom modelu. U oba modela analizirana je izraženost gena povezanih sa signalnim putem Notch i aktivnošću HSC.



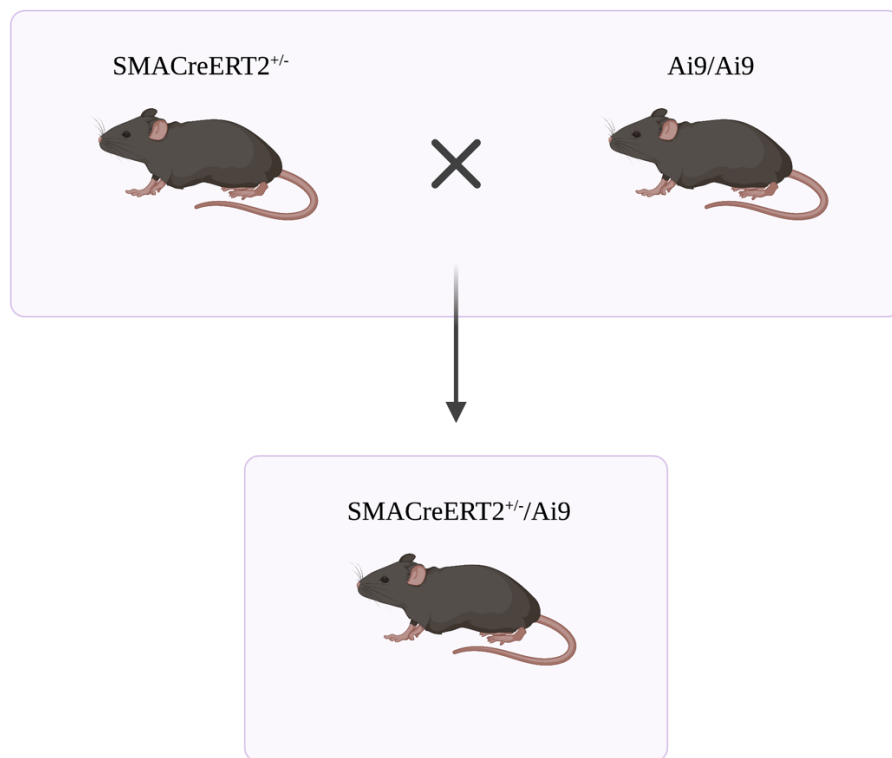
Slika 4.1. Postupak izazivanja fibroze primjenom CCl₄. Mužjaci soja C57BL/6 u dobi od 6 do 8 tjedana dobivali su svaki drugi dan CCl₄ (pokusna skupina) ili kukuruzno ulje (kontrolna skupina) tijekom 6 tjedana. Kako bi se pratio razvoj fibroze, dio životinja žrtvovan je nakon 2, a dio nakon šest tjedana. U obje vremenske točke uzeti su uzorci tkiva i seruma za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Shema kreirana na BioRender.com.



Slika 4.2. Postupak izazivanja fibroze korištenjem prehrane s dodatkom spoja DDC. Mužjaci soja C57BL/6 u dobi od 6 do 8 tjedana konzumirali su hranu s dodatkom spoja DDC ili standardnu hranu tijekom 4 tjedna. Kako bi se pratio razvoj fibroze, dio životinja žrtvovan je nakon 2, a dio nakon 4 tjedna. U obje vremenske točke uzeti su uzorci tkiva i seruma za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Shema kreirana na BioRender.com

4.2.2. Druga faza istraživanja

U drugoj fazi istraživanja korišteni su miševi transgeničnih sojeva SMACreERT2 i Ai9, oba temeljnog soja C57BL/6. Miševi soja SMACreERT2 nose rekombinazu Cre vezanu za promotor gena za α SMA. Ovaj soj miševa održavan je kao heterozigot za rekombinazu Cre, dok su miševi soja Ai9 održavani kao homozigoti za reporterski gen tdTomato. Njihovim križanjem (Slika 4.3) dobiveni su potomci koji nakon primjene tamoksifena počinju izražavati fluorescentni biljeg tdTomato u stanicama koje izražavaju α SMA. Primjenom dvije injekcije tamoksifena (75 μ g/g, otopljen u kukuruznom ulju) 5 i 7 dana prije započinjanja postupka izazivanja jetrene fibroze primjenom CCl₄ ili spoja DDC, kako je opisano gore, biljeg tdTomato su počele izražavati samo stanice koje konstitucijski izražavaju α SMA, dok su u pokusima u kojima je tamoksifen primijenjen nakon početka postupka (3., 5. i 7. dan od započinjanja tretmana (CCl₄ ili DDC)) za izazivanje jetrene fibroze biljegom tdTomato označene i aktivirane HSC. Kao kontrolna skupina korišteni su miševi iz istog legla koji ne izražavaju rekombinazu Cre.

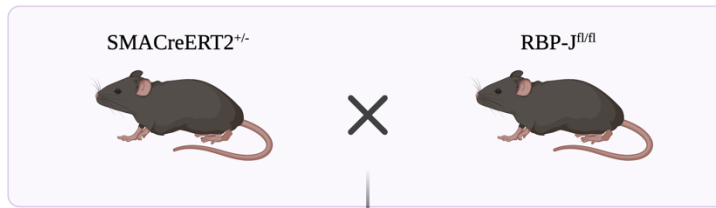


Slika 4.3. Shema križanja transgeničnih miševa sojeva SMACreERT2 i Ai9/Ai9. Shema kreirana na BioRender.com

4.2.3. Treća faza istraživanja

U trećoj fazi istraživanja analiziran je učinak inhibicije signalnog puta Notch na razvoj jetrene fibroze. U ovoj fazi korišteni su miševi sojeva SMACreERT2 i RBP- $\text{J}^{\text{fl/fl}}$. Parenjem ovih sojeva u prvom koraku dobiveni su potomci koji su heterozigoti za oba svojstva, rekombinazu Cre i RBP- $\text{J}^{\text{fl/fl}}$. U sljedećem koraku, kroz dva kruga križanja ovih miševa s miševima soja RBP- $\text{J}^{\text{fl/fl}}$ dobiveni su potomci koji su heterozigoti za rekombinazu Cre i homozigoti za RBP- $\text{J}^{\text{fl/fl}}$ te u kojih se primjenom tamoksifena, u stanicama koje izražavaju αSMA , inhibira signalni put Notch. Miševi koji su izražavali rekombinazu Cre bili su pokusna, a miševi iz istog legla koji ju nisu izražavali, kontrolna skupina (Slika 4.4). Obje skupine životinja tretirane su na identičan način kemikalijama za izazivanje fibroze (CCl_4 ili DDC) i tamoksifenom (3x tjedno).

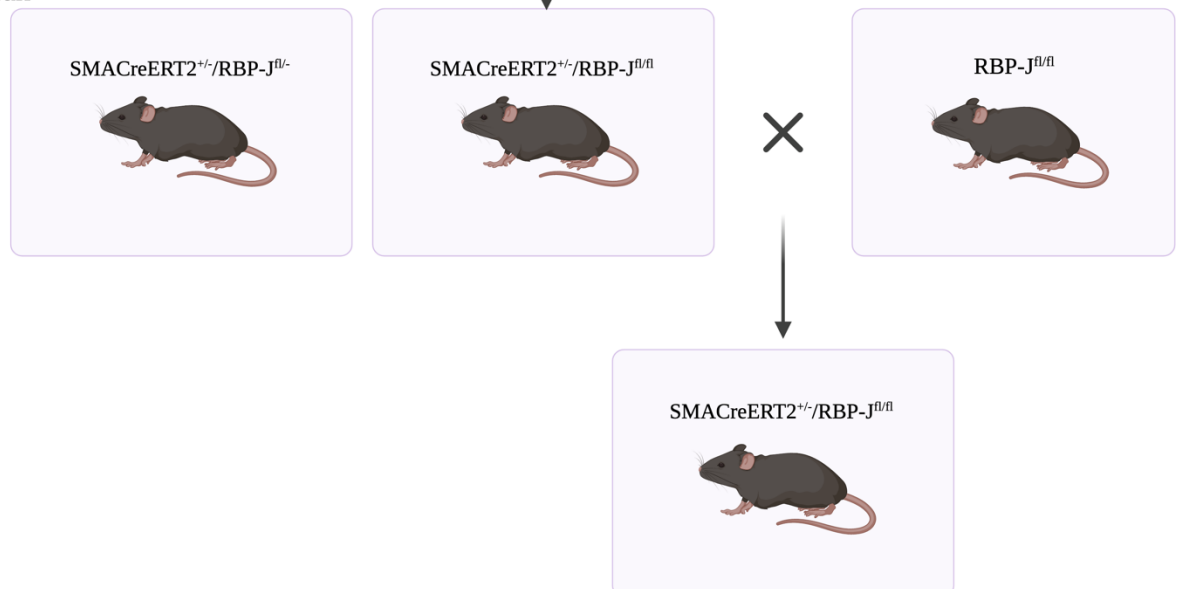
1. korak



2. korak



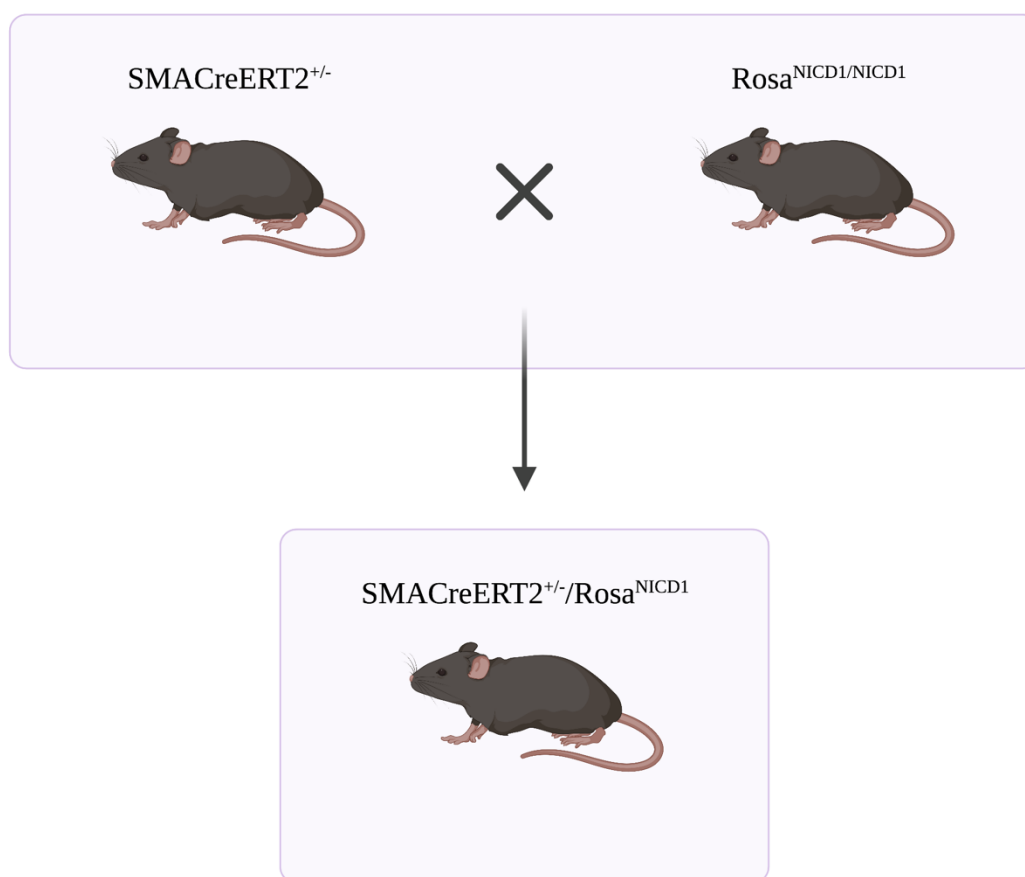
3. korak



Slika 4.4. Shema križanja miševa sojeva SMACreERT2 i RBP-J^{fl/fl}. U prvom koraku križani su miševi sojeva SMACreERT2 i RBP-J^{fl/fl}. Rezultat tog križanja su potomci koji ili nose ili ne nose gen za rekombinazu Cre, a heterozigoti su za za RBP-J^{fl/fl}. U drugom koraku križani su potomci iz prvog koraka koji su nositelji gena za rekombinazu Cre s miševima soja RBP-J^{fl/fl}. Rezultat su ponovno miševi koji ili nose ili ne nose gen za rekombinazu Cre te su ili homozigoti ili heterozigoti za RBP-J^{fl/fl}. Zadnji korak uključuje križanje miševa koji su nositelji gena za rekombinazu Cre, a homozigoti su za RBP-J^{fl/fl} s miševima soja RBP-J^{fl/fl} kako bi svi potomci proizašli iz tog križanja bili homozigoti za RBP-J^{fl/fl}. Shema kreirana na BioRender.com.

4.2.4. Četvrta faza istraživanja

U četvrtoj fazi istraživanja analiziran je učinak aktivacije signalnog puta Notch na razvoj jetrene fibroze. U ovoj fazi korišteni su miševi sojeva SMACreERT2 i Rosa^{NICD1}. Njihovim križanjem dobiveni su potomci koji su heterozigoti za rekombinazu Cre, kao i za gen za NICD, a u kojima se primjenom tamoksifena pojača aktivnost Notch unutarstanične domene 1 (NICD1) u stanicama koje izražavaju α SMA. Kao kontrolna skupina korišteni su miševi iz istog legla koji nisu izražavali rekombinazu Cre kako bi se isključio učinak samog tamoksifena na razvoj fibroze (Slika 4.5). Obje skupine životinja tretirane su na identičan način kemikalijama za izazivanje fibroze (CCl₄ ili DDC) i tamoksifenom (3x tjedno).



Slika 4.5. Shema križanja miševa sojeva SMACreERT2 i Rosa^{NICD1}. Križanjem miševa soja SMACreERT2 koji su heterozigoti za rekombinazu Cre i miševa soja Rosa^{NICD1} koji su homozigoti za NICD1 dobiveni su potomci koji ili izražavaju ili ne izražavaju gen za rekombinazu Cre te su heterozigoti za NICD1. Shema kreirana na BioRender.com

4.2.5. Peta faza istraživanja

Miševi soja C57BL/6 su po tipu prehrane podijeljeni u skupine hranjene standardnom hranom ili hranom s dodatkom 0,025% spoja DDC kroz 4 tjedna. U svakom tipu prehrane jedna skupina životinja tretirana je tamoksifenom (75 µg, i.p. 1x dnevno), a druga skupina primila je identičnu količinu vehikuluma (kukuruzno ulje).

4.3. Genotipizacija pokusnih životinja metodom PCR

Kako bi se potvrdilo uspješno križanje transgeničnih mišjih sojeva, korištena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) i gel elektroforeza. Mišja DNA izolirana je iz repa tako što je komadiću repa dodano 450 µL otopine pufera i proteinaze K te je inkubiran preko noći na 56 °C. Nakon toga uzorci su centrifugirani (14000 rpm, 20 min, sobna temperatura) te je supernatant prebačen u novu tubicu. Supernatantu je dodan izopropanol u omjeru približno 1:1 te su uzorci promiješani do vizualizacije DNA mrežice. Uzorci su ponovno centrifugirani (14000 rpm, 5 min, sobna temperatura) te je supernatant odliven. U tubice je dodano 800 µL etanola te su uzorci ponovno centrifugirani (14000 rpm, 2 min, sobna temperatura). Supernatant je odliven, a uzorci su sušeni na 37 °C tijekom 90 min kako bi etanol ishlapio. DNA je zatim otopljena u 150 µL destilirane vode. Za umnožavanje dobivene DNA korištene su komercijalno dostupne kemikalije.

Tablica 1. Setovi početnica korišteni za genotipizaciju transgeničnih sojeva miševa

Soj	Početnica 1	Početnica 2	Početnica 3	Početnica 4
SMACreER T2	5'- GATGGATTTCCGTC TCTGGTGTAG-3'	5'- AGCTTGCATGATCT CCGGTATTG-3'		
Ai9	5'- CTGTTCTGTACGG CATGG-3'	5'- AAGGGAGCTGCAG TGGAGTA-3'	5'- GGCATTAAAGCAG CGTATCC-3'	5'- CCGAAAATCTGTG GGAAGTC-3'
RBP-J ^{fl/fl}	5'- GTTCTTAACCTGTT GGTCGGAACC-3'	5'- GCTTGAGGCTTGAT GTTCTGTATTGC-3'	5'- GCAATCCATCTTGT TCAATGGCC-3'	
Rosa ^{NICD1}	5'- AAAGTCGCTCTGA GTTGTTAT-3'	5'- GCGAAGAGTTTGT CCTCAACC-3'	5'- GGAGCGGGAGAAA TGGATATG-3'.	

4.4. Izazivanje jetrene fibroze

Fibroza je potaknuta korištenjem dva modela, toksičnog modela koji se izaziva primjenom CCl_4 (11, 49) te modela prehrane s dodatkom spoja DDC (11, 50). CCl_4 je primjenjivan 2 puta tjedno tijekom 6 tjedana intraperitonejskom injekcijom 1,0 ml/kg CCl_4 otopljenog u kukuruznom ulju u omjeru 1:3. U pokusima koji uključuju miševe soja SMACreERT2/Ai9, jedna grupa je 7 i 5 dana prije početka tretmana CCl_4 primila tamoksifen u dozi od 75 $\mu\text{g/kg}$ kako bi bio se potaknulo izražavanje fluorescentnog biljega tdTomato u stanicama koje bazalno izražavaju αSMA , dok je drugoj skupini tamoksifen injiciran nakon početka tretmana kako bi se uz prethodno navedene stanice prikazale i aktivirane HSC koje su tada počele izražavati αSMA . Da bi se izazvala bilijarna fibroza, miševi su tijekom 4 tjedna biti hranjeni hranom nadopunjenom spojem DDC. U početnom pokusu životinje su najprije primale hranu s 0,1 % spoja DDC, što je doza najčešće korištena u literaturi, ali nakon što smo uočili da ova doza izaziva prejako oštećenje i da velik broj miševa mora biti eutanaziran, udio spoja DDC smanjili smo na 0,025%. Ova doza je izazvala bilijarnu fibrozu sa svim značajkama opisanim u literaturi. Pretpostavljamo da je razlika u dozi nastala jer je spoj DDC dodan tvornički u standardnu laboratorijsku hranu u obliku keksa učinkovitiji od onog dodanog laboratorijski u smrvljenu hranu.

4.5. Histološka analiza

Uzorci jetre fiksirani su u 4% paraformaldehidu na 4 °C, inkubirani preko noći u 30% otopini saharoze u puferu PBS te uklopljeni u Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Kako bi se procijenio stupanj fibroze rezovi su obojeni bojom Sirius red koja obilježava kolagen. Za analizu stanica koje izražavaju fluorescentni biljeg Tdtomato korišten je fluorescentni mikroskop (Axiovert 200; Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Njemačka). Imunohistokemijsko bojenje na αSMA korišteno je za analizu miofibroblasta, a bojenje na citokeratin 19 za analizu kolangiocita. Za analizu slika korišten je program ImageJ (ImageJ 1.52a).

4.6. Aktivnost aminotransferaza

Za analizu seruma prilikom žrtvovanja miševa prikupljena je krv iz orbitalnog spleta (≈ 1 mL). Nakon što je krv ostavljena na sobnoj temperaturi do stvaranja ugruška (≈ 2 h), uzorci su centrifugirani 10 minuta na 8000 rpm. Uzorak seruma uzet je u duplikatu te pohranjen na -20°C do analize. Koncentracije ALT i AST u serumu određene su standardnim laboratorijskim metodama u kliničkom dijagnostičkom laboratoriju pomoću uređaja Olympus AU400.

4.7. Mjerenje sadržaja kolagena u jetri

Udio kolagena u homogenatima jetrenog tkiva procijenjen je mjerenjem udjela hidroksiprolina komercijalno dostupnim setom kemikalija prema uputama proizvođača (Hydroxyproline Assay Kit, kat. br: MAK008, Sigma-Aldrich) uz manje modifikacije (52). Uzorci jetrenog tkiva smrznuti su u tekućem dušiku i uskladišteni na -80°C do analize. Nakon vaganja, uzorci su homogenizirani u destiliranoj vodi (10 mg tkiva na 100 μL vode). Nakon homogenizacije, uzorku je dodan 12 M HCl u istom volumenu, uzorak je zatim hidroliziran je na 100°C tijekom 20 sati u polipropilenskim tubicama s termostabilnim poklopcem. Nakon što su se uzorci ohladili, centrifugirani su (10000 g, 3 min, sobna temperatura) te je odvojen supernatant. Supernatant je osušen u vakuumskoj centrifugi na 60°C . Nakon toga, uzorci su inkubirani u 100 μL Chloramin T/Oxydation Buffer Mixture tijekom 5 min, nakon čega im je dodano 100 μL svježe pripremljenog 4-(dimetilamino) benzaldehid (DMAB) reagensa. Uzorci su zatim inkubirani na 60°C tijekom 90 min, nakon čega je izmjerena apsorbancija na 560 nm. Na kraju je izračunata koncentracija uz pomoć standardne krivulje napravljene pomoću standarda iz seta (53).

4.8. Izolacija i kultura jetrenih zvjezdolikih stanica

Učinak pojačane aktivacije i inhibicije signalnog puta Notch ispitan je na primarnoj kulturi HSC. Izolacija stanica rađena je po protokolu koji je opisao Mederacke (51). Nakon što je životinja dovedena u opću anesteziju primjenom kombinacije ketamina i ksilazina, retrogradnom perfuzijom kroz donju šuplju venu vrši se digestija jetre *in situ* uzastopnom perfuzijom puferom EGTA (prema engl. *Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) (1-2 min), otopinom pronaze (5 min) i naposljetku kolagenaze (7 min). Jetra

se potom izolira iz miša i dalje *in vitro* tretira otopinom kolagenaze i pronaze (20-25 min). HSC se na kraju odvajaju centrifugiranjem (10 min, 580 g, 4°C) i gradijentom Nycodenz (Accurate Chemicals) (17 min, 1380 g, 4°C, bez kočnica). Stanicama je dalje dodan TRIzol reagens te je izolirana RNA ili su korištene za kulturu. Prije uzgoja u kulturi, stanice su izbrojene u Bürker-Türkovoj komorici uz upotrebu 0,05% tripanskog modrila kako bi se isključile mrtve stanice, a zatim su zasijane u pločicu s 24 zdenca u gustoći od 2×10^5 stanica po zdencu. Za uzgoj je korišten medij DMEM (prema engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) obogaćen s 10% telećim fetalnim serumom (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*) (Gibco™, Thermo Fisher), 100 U/mL penicilina (Gibco™, Thermo Fisher) i 100 U/mL streptomcina (Gibco™, Thermo Fisher). Kultura stanica održavana je do aktivacije HSC i njihove fenotipske promjene u miofibroblaste uz zamjenu medija svakih 48 sati. Kako bi izazvali aktivaciju rekombinaze Cre, u medij je tijekom prva 24 sata kulture dodan hidroksitamoksifen (1 μ M, u 1 μ L apsolutnog etanola).

4.9. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica

Svježe izolirane HSC dodatno su pročišćene razvrstavanjem stanica (FACS Aria II, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) uz učinkovitost >99%. Izolirane stanice za razvrstavanje nije bilo potrebno dodatno bojiti jer je iskorišteno njihovo svojstvo autofluorescencije pod ekscitacijom ljubičastim laserom (405 nm) zbog uskladištenog vitamina A (51). Za protočnocitometrijsku analizu stanicama je nakon izolacije dodano anti-Notch1 protutijelo obilježeno fikoeritrinom (Anti Notch1 (klon HMN1-12), kat. broj:130607, Biolegend, 1:20) nakon inkubacije (30 minuta, 4° C) stanice su oprane i analizirane na uređaju FACS Aria II. Za obradu dobivenih podataka korišten je program za analizu FlowJo v10 (TreeStar, Ashland, OR, SAD).

4.10. Analiza izraženosti gena metodom qPCR

Za analizu izraženosti gena povezanih s aktivnošću HSC i signalnim putem Notch korištena je metoda qPCR. Iz cjelokupnog tkiva jetre, svježe izoliranih HSC, kao i HSC iz kulture izolirana je RNA. Homogenati tkiva i suspenzije stanica inkubirani su u TRIzol reagensu (Sigma-Aldrich) na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim je dodano 200 μ l kloroforma te je uzorak

promiješan. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran 15 minuta na 12000 rpm na 4°C. Tijekom centrifuge uzorak je raslojen na tri sloja. Gornji sloj, koji sadrži RNA otpipetiran je u novu epruvetu gdje je pomiješan s izopropanolom u omjeru 1:1 kako bi se RNA isprecipitirala. Nakon kratke inkubacije na sobnoj temperaturi u slučaju tkivnih homogenata ili inkubacije na -20°C preko noći u slučaju staničnih suspenzija, uzorak je centrifugiran 15 minuta na 12000 rpm i 4°C. Izopropanol je zatim odliven, u epruvetu s talogom RNA dodan je 1 mL 75% etanola te je uzorak centrifugiran 5 minuta na 7500 rpm i 4°C. Nakon odlijevanja etanola, talog RNA osušen je na sobnoj temperaturi s otvorenom epruvetom i zatim resuspendiran u odgovarajućem volumenu dH₂O. Koncentracija i čistoća uzorka izmjerena je spektrofotometrom NanoDrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD). Koristeći High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) RNA je procesom obrnutog prepisivanja prepisana u cDNA slijedeći upute proizvođača, a koristeći volumen izolirane RNA koji odgovara količini 1 µg. RNA otopljen u vodi inkubirana je s 50 jedinica enzima reverzne transkriptaze (MultiScribe™ MuLV, Applied Biosystems), 10 jedinica inhibitora RNaze (RNase Inhibitor, Applied Biosystems), puferom RT, nasumičnim početnicama te mješavinom deoksiribonukleotida u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) sat vremena na temperaturi od 37°C, a nakon toga se reakcija zaustavlja zagrijavanjem na 95°C. Dobivena cDNA je umnožena uređajem ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) te je analizirana izraženost gena povezanih s aktivnošću HSC (*Colla1*, *Acta2*) i gena povezanih sa signalnim putem Notch (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Hes1*, *Hey1*, *HeyL*) i *Gapdh* kao endogena kontrola. Za analizu izraženosti navedenih gena korišten je set komercijalno dostupnih kemikalija TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master Mix. TaqMan Gene Expression Master mix sadrži DNA polimerazu (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase, Applied Biosystems), uracil-N glikozilazu za uklanjanje eventualno prisutnih PCR produkata koji bi mogli kontaminirati reakciju te referentnu boju ROX™, unutarnju kontrolu za normalizaciju signala. TaqMan® Gene Expression Assay sadrži početnice i probu specifične za mjereni gen. Proba je obilježena sa fluorescentnom bojom FaM™ na 5' kraju te prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. nonfluorescent quencher) na 3' kraju. DNA polimeraza iz mješavine TaqMan Gene Expression Master mix prema predlošku cDNA izgrađuje novi lanac nukleotida počevši od mjesta vezanja početnica. Dolazeći do probe, polimeraza cijepa probu te udaljuje boju FAM od prigušivača, što izaziva

fluorescentni signal. qPCR reakcija provedena je u pločici sa 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems), u ukupnom volumenu od 25,5 μ l (1 μ l cDNA, 1,25 μ l TaqMan® Gene Expression Assay, 12,5 μ l TaqMan Gene Expression Master mix, 11,75 μ l H₂O). Reakcija započinje inkubacijom 2 minute na 50°C, da bi se aktivirala uracil-N glikozilaza, zatim slijedi inkubacija od 10 minuta na 95°C, tijekom koje se inaktivira uracil-N glikozilaza, a aktivira DNA polimeraza. Slijedi 40 ciklusa naizmjenične inkubacije na 95 °C 15 sekundi, pri čemu dolazi do denaturacije DNA te 60°C tijekom 60 sekundi, kada se vežu početnice te stvara komplementarni DNA lanac. Izraženost gena izračunata je $\Delta\Delta C_t$ metodom te je izražena kao relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu (prosječan ΔC_t kontrolne skupine).

4.11. Statistička analiza

Ukupan broj životinja korištenih u pojedinačnim pokusima izračunat je prema snazi studije (80%) te odabranoj razini statističke značajnosti, na temelju dosadašnjih pokusa u našem laboratoriju, koristeći program G*power. Podatci su prikazani u obliku aritmetičke sredine i standardne devijacije. Raspodjela podataka provjerena je Shapiro-Wilk testom, a razlika među skupinama provjerena je Studentovim t-testom u slučaju dvije skupine, a ANOVA testom u slučaju tri ili više skupina. Varijable koje nisu normalne raspodjele (zbog jedne vrijednosti veće od aritmetičke sredine + 3 standardne devijacije) su logaritmirane kako bi se normalizirala raspodjela. Statistička analiza napravljena je u programu GraphPad Prism version 9 for macOS (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), a $p < 0,05$ prihvaćena je kao statistički značajna.

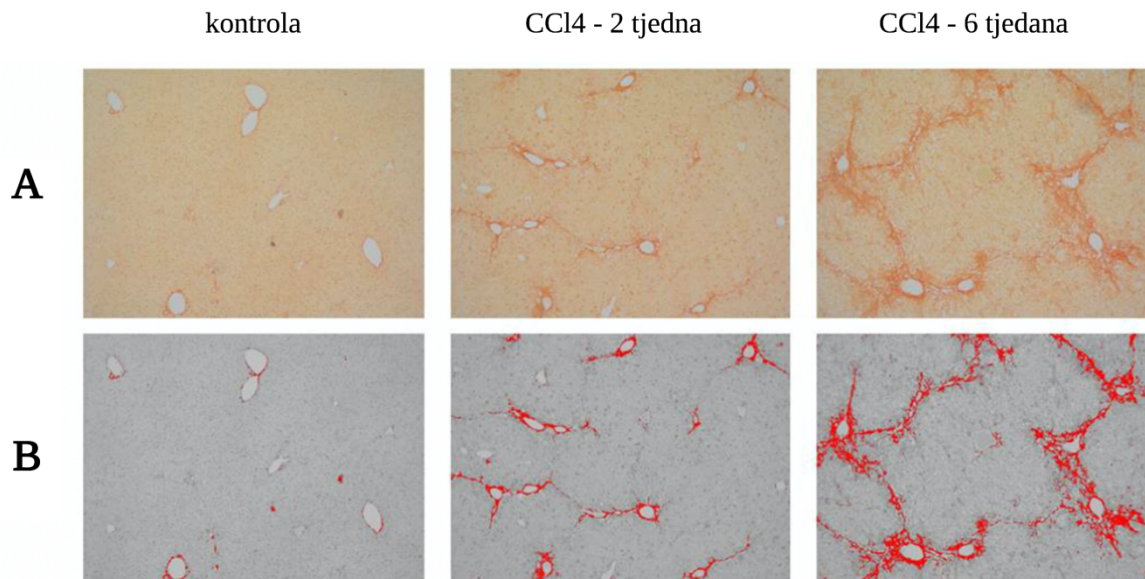
5. Rezultati

5.1. Prva faza istraživanja

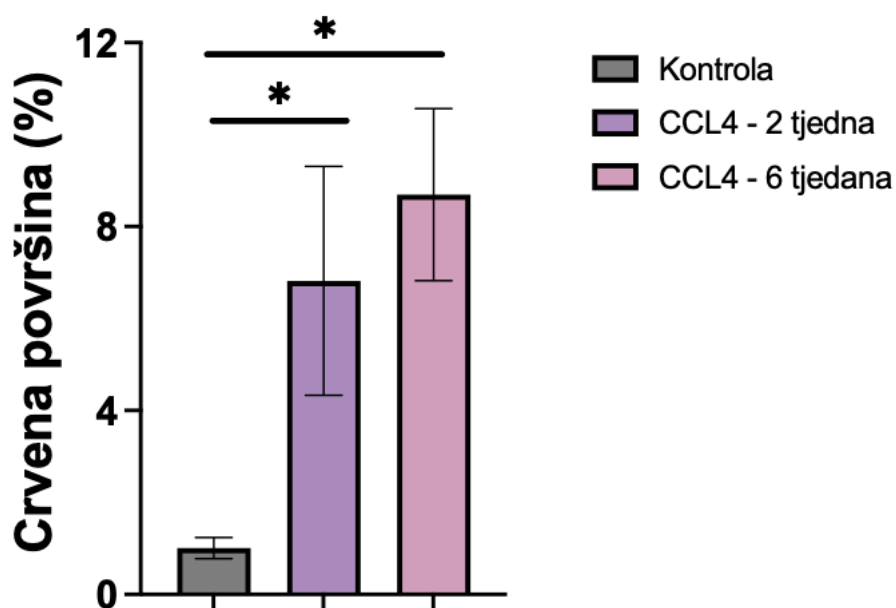
Cilj ove faze istraživanja bio je uspostaviti odgovarajuće protokole za izazivanje fibroze primjenom CCl_4 i primjenom prehrane obogaćene spojem DDC te analizirati mijenja li se izraženost gena povezanih sa signalnim putem Notch u jetrenom tkivu.

5.1.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl_4

Miševi soja C57BL/6 su tijekom 6 tjedana primali CCl_4 (pokusna skupina) ili kukuruzno ulje (kontrolna skupina) i žrtvovani su u nekoliko vremenskih točaka. Tijekom tih 6 tjedana, fibroza se progresivno povećavala, što je pokazano histološki (Slika 5.1.). Histološke slike analizirane su pomoću programa za analizu ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena bojom sirius red u crveno (kolagen). Skupina tretirana CCl_4 imala je značajno veći postotak crvene površine u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 2 tjedna, a nakon 6 tjedana tretmana fibroza je bila još razvijenija (Slika 5.2.).

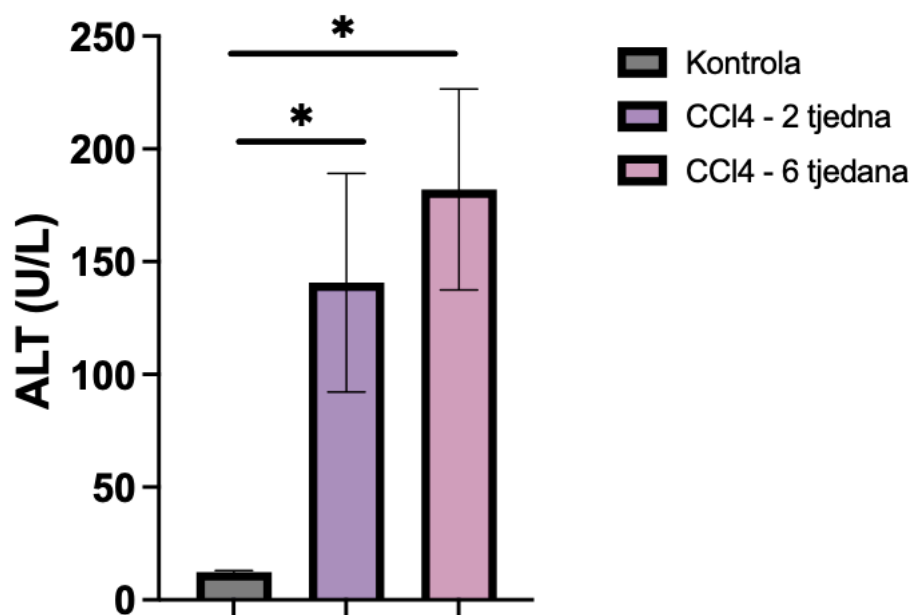


Slika 5.1. Izazivanje fibroze primjenom CCl_4 . Lijevi stupac prikazuje kontrolnu skupinu koja je tretirana kukuruznim uljem. Srednji stupac prikazuje skupinu koja je tretirana CCl_4 i žrtvovana nakon dva tjedna. Desni stupac prikazuje skupinu koja je tretirana CCl_4 i žrtvovana nakon šest tjedana. **A.** Tkivo jetre obojeno je metodom Sirius red i uslikano na svjetlosnom mikroskopu. Histološke slike pokazuju progresivno više kolagena u jetrenom tkivu miševa pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije razvila fibrozu. **B.** Iste fotografije nakon obrade pomoću programa ImageJ. Povećanje 100x

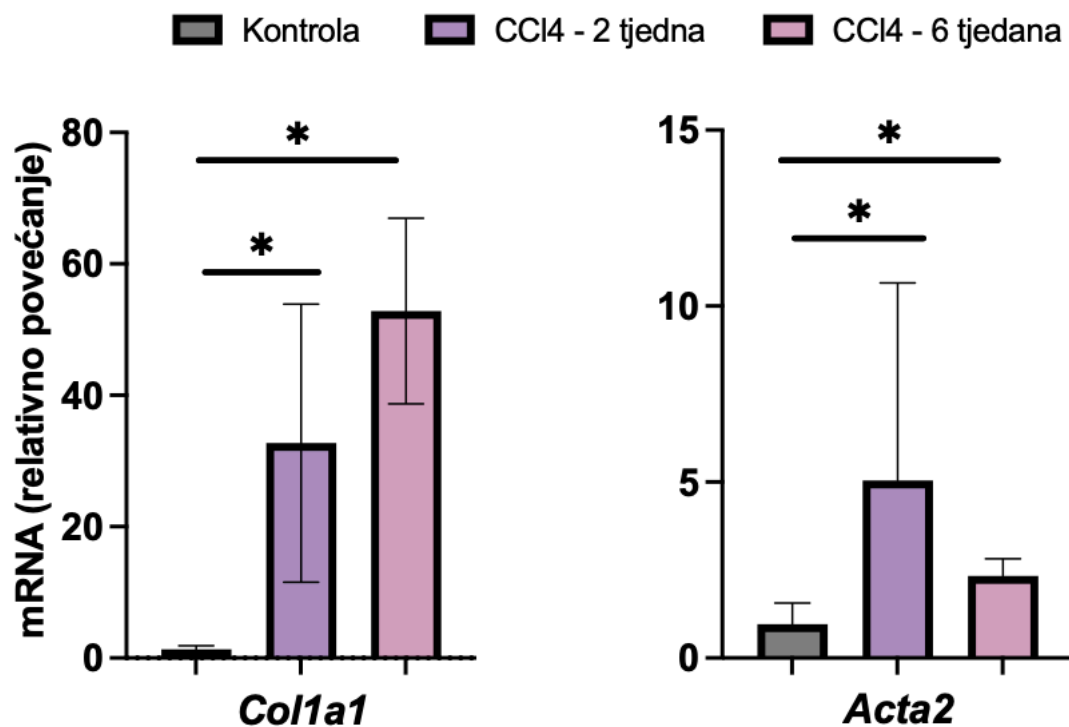


Slika 5.2. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ. Graf prikazuje postotak preparata prekriven crvenom površinom, odnosno koliki udio tkiva predstavlja kolagen, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Kontrolna skupina ima najmanji udio kolagena, dok pokusna skupina koja je primala CCl₄ tijekom 6 tjedana ima najveći udio kolagena u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. * označava $p < 0,05$. ANOVA-test. N=6-8

Izraženost gena u jetrenom tkivu analizirana je metodom qPCR te je pronađena povećana izraženost gena povezanih s fibrozom (*Coll1a1*) i aktivnošću HSC (*Acta2*) (Slika 5.3.). U serumima je izmjerena i aktivnost ALT, a rezultat je u skladu s histološkim nalazom, odnosno, kontrolna skupina ima normalne serumske koncentracije ALT, dok se u pokusnoj skupini vidi umjereni porast (Slika 5.4.). Ovaj umjeren porast aminotransferaza karakterističan je za kronično oštećenje jetre dok bi veći porast aminotransferaza sugerirao izrazito prisustvo akutnog oštećenja jetre uzrokovano primjenom CCl₄.

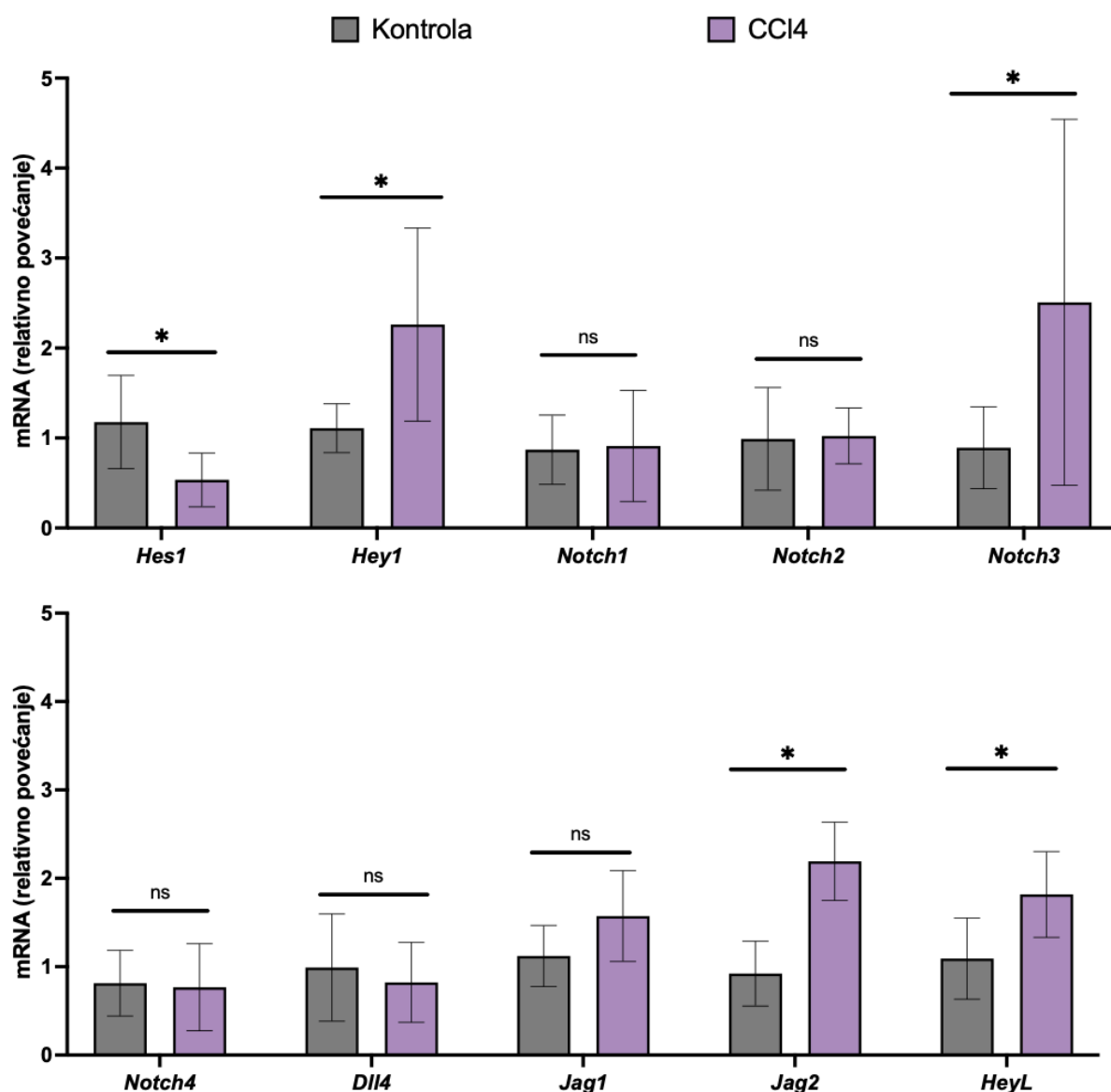


Slika 5.3. Serumska aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT). Graf prikazuje serumske vrijednosti ALT u kontrolnoj (normalne vrijednosti) i u pokusnim skupinama (umjeren porast). Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. * označava $p < 0,05$.ANOVA-test. N=6-8



Slika 5.4. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom primjenom CCl₄. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. * označava $p < 0,05$. ANOVA-test. N=6-8

Konačno, analizirana je i izraženost gena povezanih sa signalnim putem Notch (Slika 5.5.). U odnosu na kontrolnu skupinu, u pokusnoj skupini značajno je poraslo izražavanje gena *Hey1*, *Notch3*, *Jag2* i *HeyL*, dok je izražavanje gena *Hes1* značajno sniženo. Izraženost gena za *Notch1*, *Notch2*, *Notch4*, *Dll4* i *Jag1* ostala je nepromijenjena.

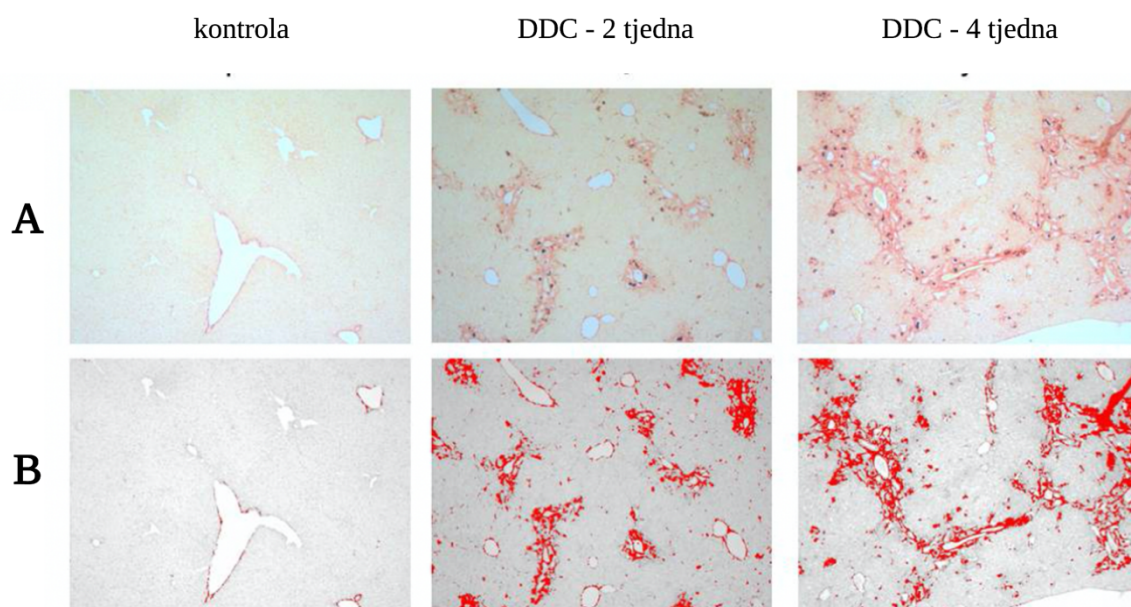


Slika 5.5. Analiza izraženosti gena povezanih sa signalnim putem Notch u modelu izazvanom primjenom CCl₄. Miševi su tijekom 6 tjedana primali CCl₄ ili kukuruzno ulje nakon čega su žrtvovani i uzeto je jetreno tkivo za analizu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno

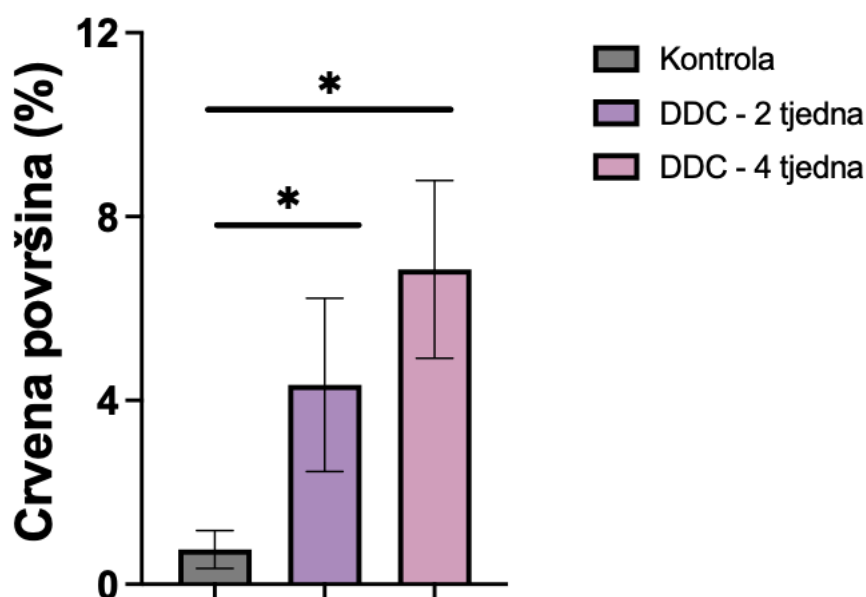
povećanje mRNA u odnosu na kontrolu.. Studentov t-test. * označava $p < 0,05$ ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). N=6-8

5.1.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC

Miševi soja C57BL/6 su tijekom 4 tjedna jeli hranu s dodatkom spoja DDC (pokusna skupina) ili standardnu hranu (kontrolna skupina) i žrtвовani su u nekoliko vremenskih točaka. Tijekom ta 4 tjedna, fibroza se progresivno povećavala, što je pokazano histološki (Slika 5.6.). Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina slike koja je obojena crveno (kolagen). Skupina tretirana spojem DDC imala je značajno veći postotak crvene površine u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5.7.).

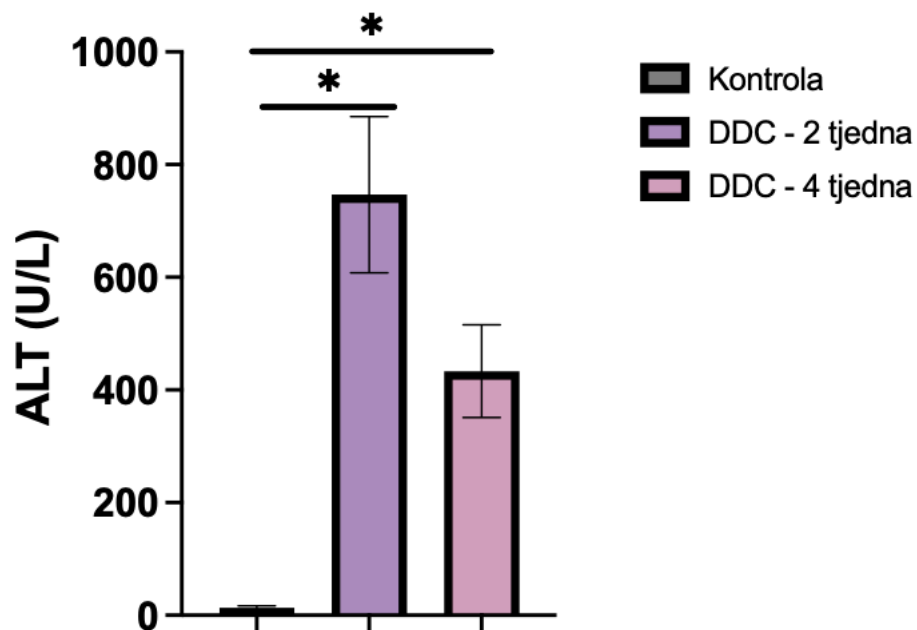


Slika 5.6. Izazivanje fibroze primjenom prehrane s dodatkom spoja DDC. Lijeви stupac prikazuje kontrolnu skupinu koja je jela standardnu hranu. Srednji stupac prikazuje skupinu koja je jela hranu s dodatkom spoja DDC i žrtвовana nakon dva tjedna. Desni stupac prikazuje skupinu koja je jela hranu s dodatkom spoja DDC i žrtвовana nakon četiri tjedna. **A.** Tkivo jetre obojeno je metodom Sirius red i uslikano na svjetlosnom mikroskopu. Histološke slike pokazuju progresivno više kolagena u jetrenom tkivu miševa iz pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije razvila fibrozu. **B.** Iste fotografije nakon obrade pomoću programa ImageJ. Povećanje 100x.

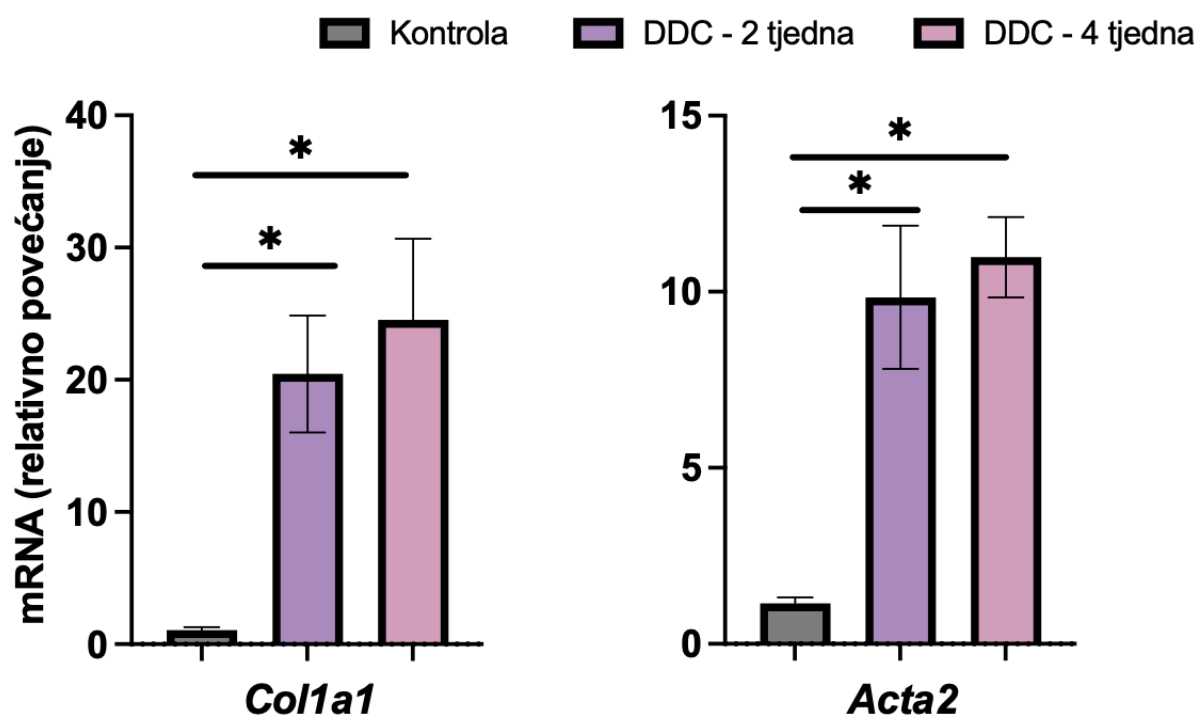


Slika 5.7. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ. Graf prikazuje postotak preparata prekriven crvenom površinom, odnosno koliki udio tkiva predstavlja kolagen, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Kontrolna skupina ima najmanji udio kolagena, dok pokusna skupina koja je jela hranu s dodatkom spoja DDC tijekom 4 tjedna ima najveći udio kolagena u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. * označava $p < 0,05$. ANOVA-test. N=6-8

Analizom jetrenog tkiva metodom qPCR pronađena je povećana izraženost gena povezanih s fibrozom (*Coll1*) i aktivnošću HSC (*Acta2*) (Slika 5.8.). U serumima je izmjerena i aktivnost ALT, a rezultat je u skladu s histološkim nalazom, odnosno, kontrolna skupina ima normalnu serumsku aktivnost ALT, dok se u pokusnoj skupini vidi umjereni porast (Slika 5.9.).

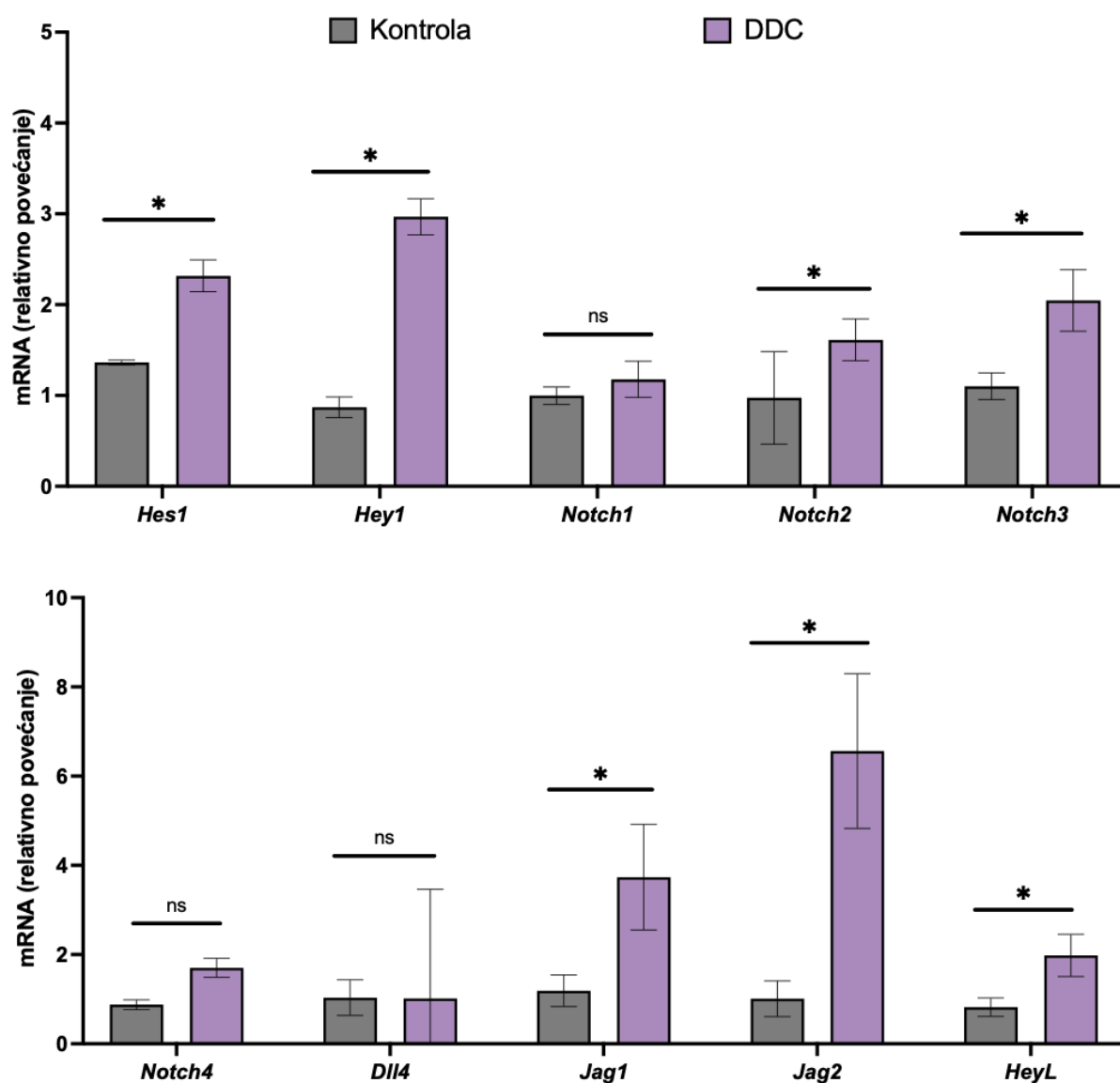


Slika 5.8. Serumska aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT). Graf prikazuje serumske vrijednosti ALT u kontrolnoj (normalne vrijednosti) i u pokusnim skupinama (umjeren porast). Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. * označava $p < 0,05$. ANOVA-test. N=6-8



Slika 5.9. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. * označava $p < 0,05$. ANOVA-test. N=6-8

Konačno, analizirana je i izraženost gena povezanih sa signalnim putem Notch (Slika 5.10.). U odnosu na kontrolnu skupinu, u pokusnoj skupini značajno je više izražavanje gena *Hes1*, *Hey1*, *Notch2*, *Notch3*, *Jag1*, *Jag2* i *HeyL*. Izraženost gena *Notch1*, *Notch4* i *Dll4* ostala je nepromijenjena.



Slika 5.10. Analiza izraženosti gena povezanih sa signalnim putem Notch u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Miševi su tijekom 4 tjedana uzimali hranu s dodatkom spoja DDC ili standardnu hranu nakon čega su žrtvovani i uzeto je jetreno tkivo za analizu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. Studentov t-test. * označava $p < 0,05$; ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). N=6-8

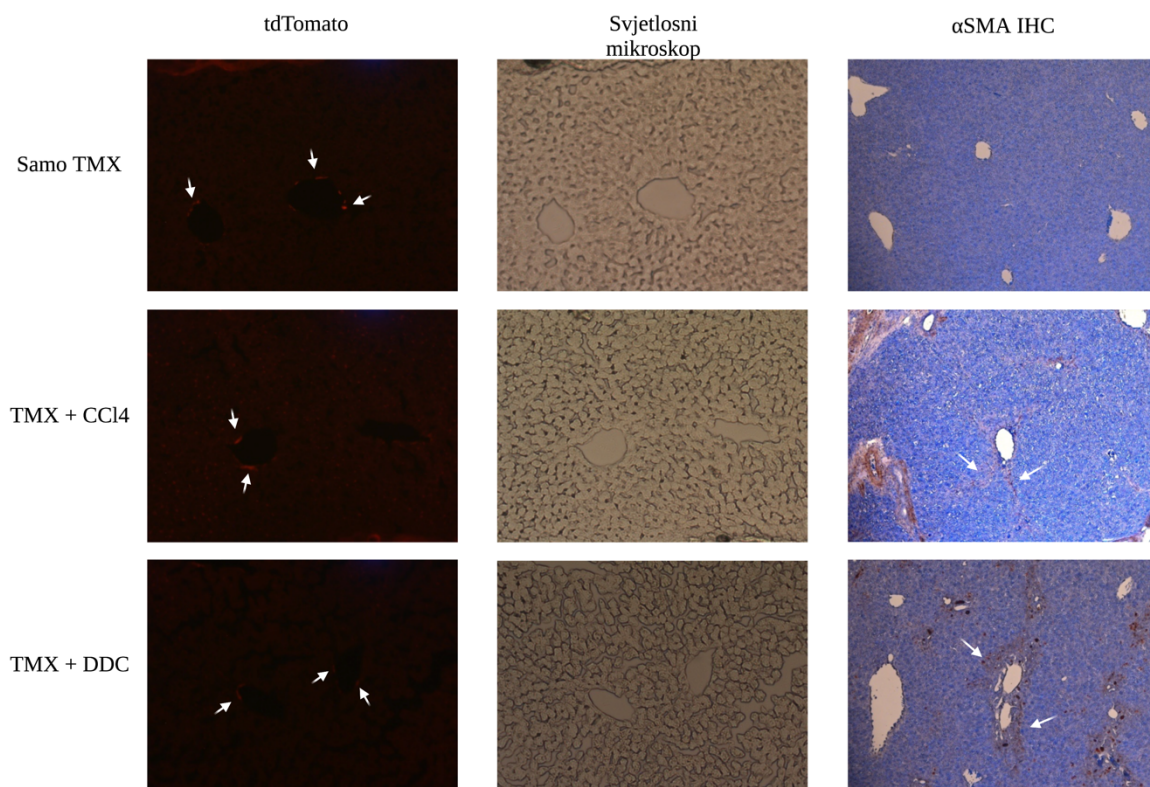
Zaključno, u ovoj fazi istraživanja uspješno smo uspostavili modele fibroze i osnovne analize, te pokazali da u oba modela dolazi do porasta izraženosti gena povezanih sa signalnim putem Notch u jetrenom tkivu zahvaćenom fibrozom.

5.2. Druga faza istraživanja

Cilj ove faze istraživanja bio je ustanoviti doprinosi li populacija stanica koje su u mirovanju pozitivne na α SMA (mezenhimski progenitori i perivaskularne stanice glatkog mišićja) populaciji miofibroblasta tijekom razvoja fibroze. U ovoj fazi istraživanja korišteni su miševi soja SMACreERT2/Ai9 kod kojih nakon primjene tamoksifena dolazi do aktivacije rekombinaze Cre i izražavanja fluorescentnog biljega tdTomato u stanicama koje izražavaju α SMA i u njihovom potomstvu.

5.2.1. Obilježavanje stanica koje izražavaju α SMA prije izazivanja fibroze

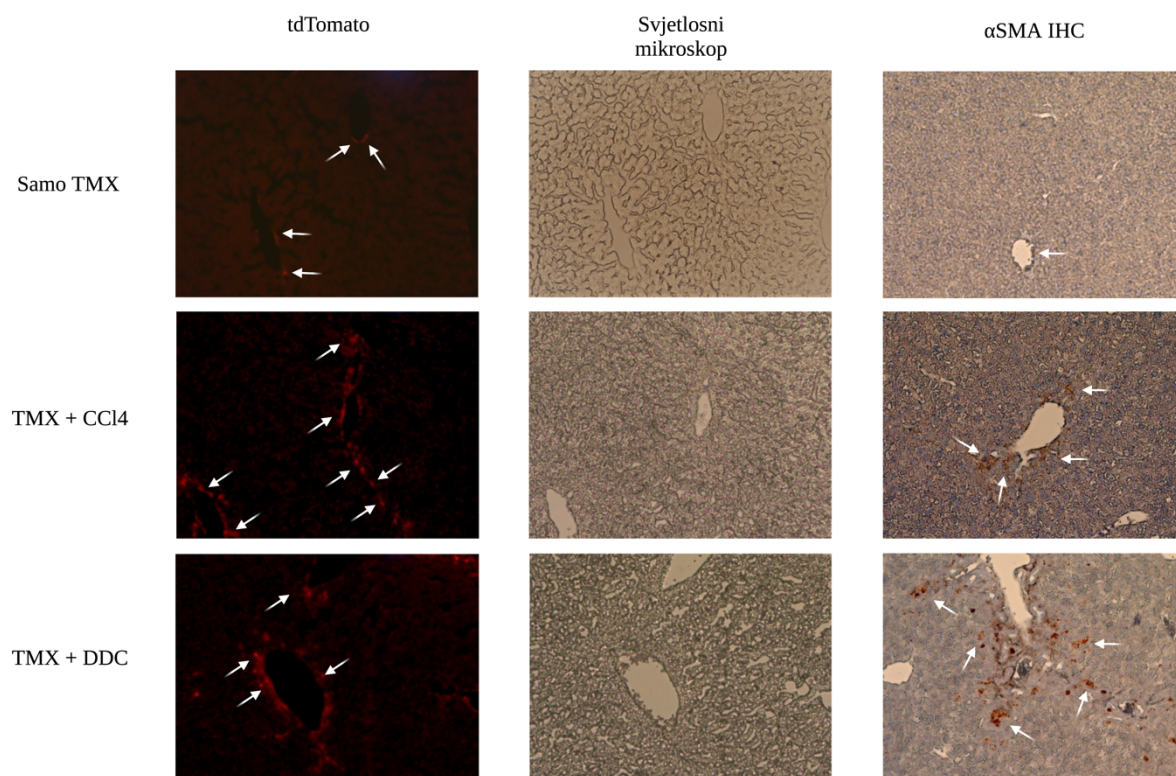
U početnom pokusu obilježili smo stanice koje bazalno izražavaju α SMA primijenivši tamoksifen prije izazivanja fibroze. U miševa koji izražavaju rekombinazu Cre tretiranih kukuruznim uljem kao i u miševa koji ne izražavaju rekombinazu Cre tretiranih tamoksifenom nismo primijetili izražavanje biljega tdTomato (nije prikazano). U miševa koji izražavaju rekombinazu Cre, a kojima je dan tamoksifen samo je mali broj perivaskularnih stanica glatkog mišića izražavao biljeg tdTomato, a imunohistokemijsko bojenje na α SMA pokazalo je sličan uzorak (Slika 5.11., gornji panel). U skupinama životinja u kojih je nakon primjene tamoksifena započet tretman izazivanja fibroze (CCl₄ ili DDC), izraženost biljega tdTomato podudara se s kontrolnom skupinom i prisutna je samo u malom broju perivaskularnih stanica. Imunohistokemijski je vidljivo znatno povećanje pozitivnog bojenja na α SMA u odnosu na kontrolnu skupinu na mjestima karakterističnim za razvoj fibroze (Slika 5.11., srednji i donji panel). Iz ovoga smo zaključili da u fibrozi ne dolazi do umnažanja stanica inicijalno pozitivnih na α SMA (mezenhimskih progenitori i perivaskularne stanice) te da glavni izvor miofibroblasta pozitivnih na α SMA moraju biti stanice koje prije izazivanja fibroze ne izražavaju α SMA, u skladu s dosadašnjim spoznajama to su HSC.



Slika 5.11. Obilježavanje stanica pozitivnih na α SMA prije izazivanja fibroze. Strelicama su označene stanice koje izražavaju biljeg tdTomato (lijevi stupac) i stanice koje se imunohistokemijski pozitivno boje na α SMA (desni stupac). Srednji stupac prikazuje vidno polje na svjetlosnom mikroskopu. TMX – tamoksifen, IHC – imunohistokemija (prema engl. *immunohistochemistry*). Povećanje 100x.

5.2.2. Obilježavanje stanica koje izražavaju α SMA nakon izazivanja fibroze

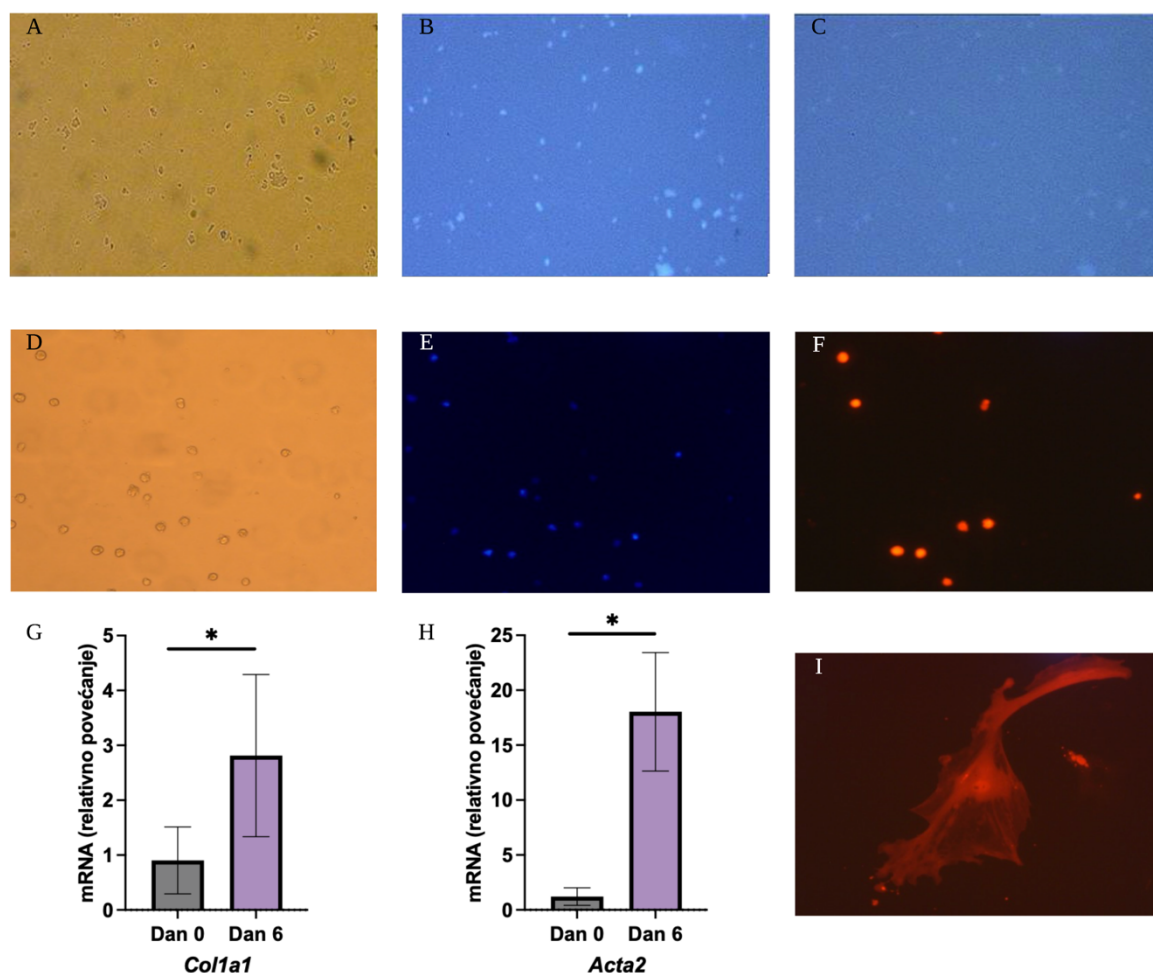
U ovom pokusu miševi su tretirani s dvije doze tamoksifena tjedan dana nakon početka tretmana izazivanja fibroze (CCl₄ ili DDC) kako bi osim u stanicama označenim u prethodnom pokusu, aktivaciju rekombinaze Cre izazvali i u HSC koje su nakon izazivanja fibroze aktivirane i počinju izražavati α SMA. Kod kontrolne skupine (ona koja je primala tamoksifen, ali ne i CCl₄ ili DDC) samo perivaskularne stanice glatkih mišića izražavaju biljeg tdTomato, dok se u pokusnim skupinama vidi velik broj stanica koje izražavaju biljeg tdTomato na mjestima koja su karakteristična za razvoj fibroze, a ista se mjesta na imunohistokemijskom bojenju boje na α SMA (Slika 5.12.)



Slika 5.12. Obilježavanje stanica pozitivnih na α SMA nakon izazivanja fibroze. Strelicama su označene stanice koje izražavaju biljeg tdTomato (lijevi stupac) i stanice koje se imunohistokemijski pozitivno boje na α SMA (desni stupac). Srednji stupac prikazuje vidno polje na svjetlosnom mikroskopu. TMX – tamoksifen, IHC – imunohistokemija (prema engl. *immunohistochemistry*). Povećanje 100x.

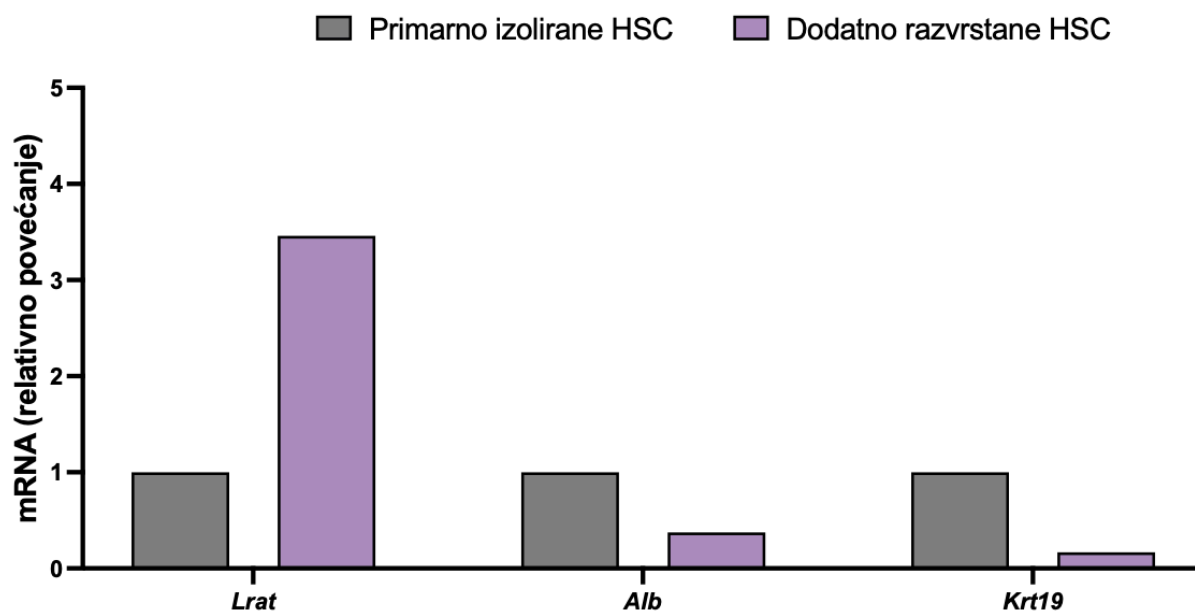
U ovoj fazi uspostavljen je i postupak za izolaciju HSC protokolom koji uključuje razgradnju jetre pronazom i kolagenazom *in situ* te odvajanje HSC gradijentom Nycodenz. Izolirane HSC pokazuju svojstvo autofluorescencije pod UV svjetlom, ali nakon nekoliko sekundi izloženosti, to svjetlo blijedi (Slika 5.13., A-C). Također smo željeli potvrditi da su stanice pozitivne na biljeg tdTomato iz prethodnog pokusa uistinu HSC. Napravili smo pokus na miševima soja SMACreERT2/Ai9 koje smo tretirali s tri injekcije CCl₄ svaki treći dan, kako bi izazvali aktivaciju jetrenih zvjezdolikih stanica, a zatim primijenili dvije injekcije tamoksifena. Nakon izolacije jetrenih zvjezdolikih stanica, analizirali smo ih pod fluorescentnim mikroskopom. Tako izolirane HSC su uz svojstvo autofluorescencije bile pozitivne i na biljeg tdTomato. Pozitivnost na biljeg tdTomato primijećena je u 40-60% autofluorescentnih stanica (Slika 5.13. D-F) ukazujući da do rekombinacije posredovane rekombinazom Cre ne dolazi u svim stanicama, što je u skladu s podacima iz literature. Stanice izolirane iz miševa soja SMACreERT2/Ai9 zasadili smo u kulturi, a rekombinaciju posredovanu rekombinazom Cre

potaknuli smo dodatkom hidroksitamoksifena u stanični medij tijekom prvog dana kulture. Tijekom 6. dana HSC su se aktivirale i poprimile karakteristični oblik miofibroblasta. Došlo je do porasta izražavanja gena za *Colla1* i *Acta2*, a pod fluorescentnim mikroskopom stanice su bile pozitivne na biljeg tdTomato (Slika 5.13. G-I). Hidroksitamoksifen dodan u medij nije imao utjecaj na izražavanje gena *Acta2* i *Colla1* (nije prikazano).



Slika 5.13. HSC pod mikroskopom izolirane iz netretiranih miševa soja C57BL/6 (A-C) i miševa SMACreERT2/Ai9 tretiranih CCL₄ i tamoksifenom. A. HSC pod svjetlosnim mikroskopom. **B.** HSC pod UV svjetlom pokazuju svojstvo autofluorescencije. **C.** Nakon nekoliko sekundi izloženosti UV svjetlu, autofluorescencija se gubi. **D.** HSC izolirane iz SMACreERT2/Ai9 pod svjetlosnim mikroskopom. **E.** HSC SMACreERT2/Ai9 pod UV svjetlom pokazuju svojstvo autofluorescencije. **F.** oko 50% stanica koje imaju svojstvo autofluorescencije je također pozitivno na tdTomato. **G, H** Izraženost gena za *Colla1* i *Acta2* u svježe izoliranim HSC (dan 0) i nakon 6 dana stanične kulture (dan 6) **I** HSC diferencirana u miofibroblast pozitivna na biljeg tdTomato(6.dan stanične kulture). Povećanje 100x.

U izoliranim HSC, nakon izolacije RNA i obrnutog prepisivanja u cDNA, analizirano je i izražavanje gena koji služe kao markeri HSC (*Lrat*), hepatocita (*Alb* - albumin) i kolangiocita (*Krt19* – citokeratin-19). Stanice koje su dodatno pročišćene staničnim razvrstavanjem, izražavale su više *Lrat*, a manje *Alb* i *Krt19* u odnosu na svježe izolirane stanice (Slika 5.14.).



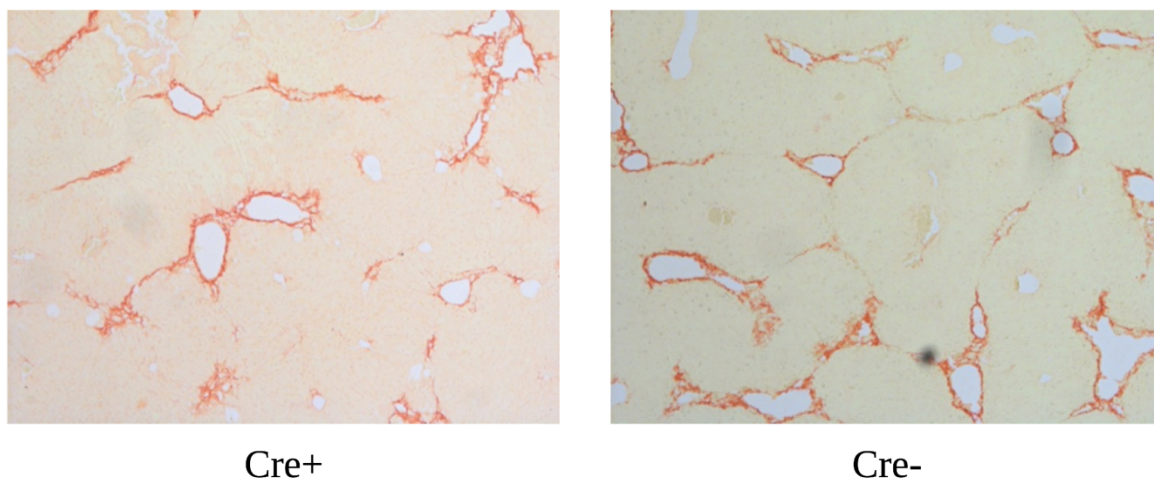
Slika 5.14. Razlika u izražavanju gena između primarno izoliranih i dodatno razvrstanih jetrenih zvjezdolikih stanica (reprezentativan uzorak). *Lrat* – lecitin-retinol aciltransferaza, *Krt19* – citokeratin 19

5.3. Treća faza istraživanja

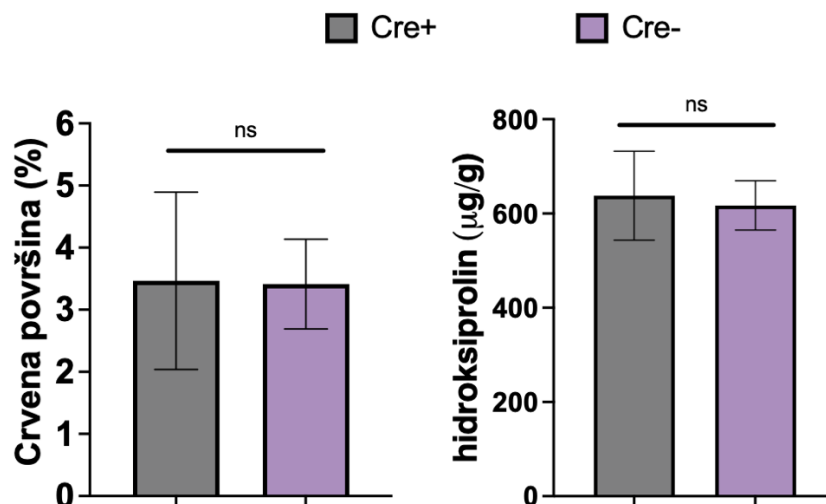
U ovoj fazi istražili smo utjecaj inhibicije signalnog puta Notch u aktiviranim HSC na razvoj fibroze u modelu fibroze uzrokovane primjenom CCl_4 i modelu fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC. Korišteni su miševi soja $\text{SMACreERT2}^{+/-}/\text{RBP-J}^{\text{fl/fl}}$.

5.3.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl_4

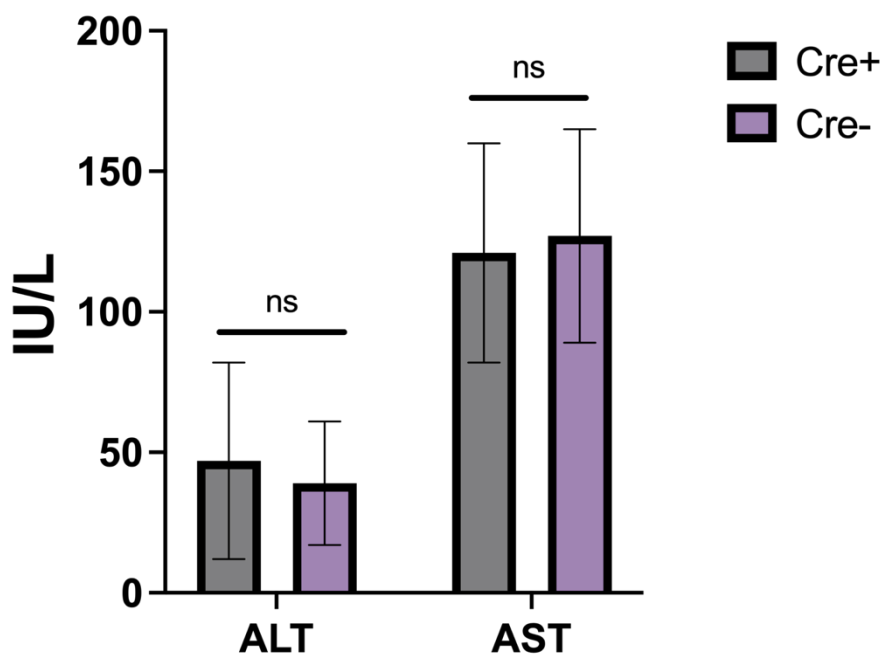
Miševi su tijekom 6 tjedana primali CCl_4 i tamoksifen kako je opisano u metodama, nakon čega su žrtvovani. Pokusnu skupinu činili su miševi soja $\text{SMACreERT2}/\text{RBP-J}^{\text{fl/fl}}$ koji izražavaju rekombinazu Cre (u daljnjem tekstu Cre^+), a kontrolnu skupinu miševi iz istog legla koji ne izražavaju rekombinazu Cre (u daljnjem tekstu Cre^-). Uzeti su uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine nije se značajno razlikovao između kontrolne i pokusne skupine. U skladu s ovim nalazima, statistički značajna razlika nije utvrđena ni u sadržaju hidroksiprolina u jetrenom tkivu kao ni u aktivnosti serumskih aminotransferaza. (Slike 5.15. - 5.17.).



Slika 5.15. Izazivanje fibroze u miševa soja $\text{SMACreERT2}/\text{RBP-J}^{\text{fl/fl}}$ primjenom CCl_4 . Miševi su tijekom 6 tjedana primali CCl_4 i tamoksifen, nakon čega su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeve slika predstavlja pokusnu skupinu (Cre^+), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre^-). Povećanje 100x.



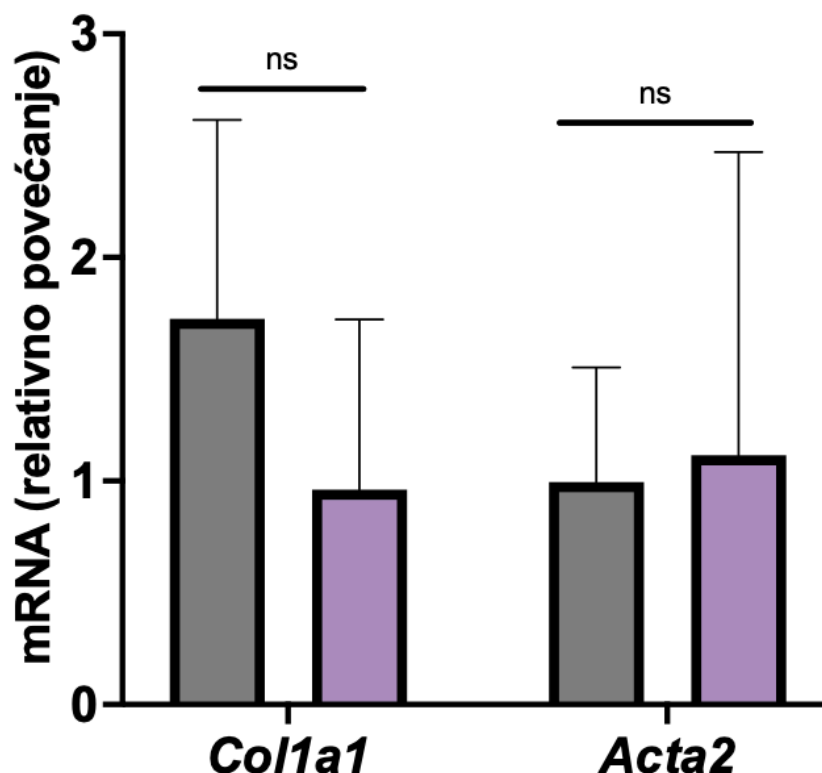
Slika 5.16. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-14



Slika 5.17. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre-) i u pokusnoj (Cre+) skupini. Nije pronađena značajna razlika među skupinama ni za ALT ni za AST. Podatci su prikazani u obliku srednje

vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-14

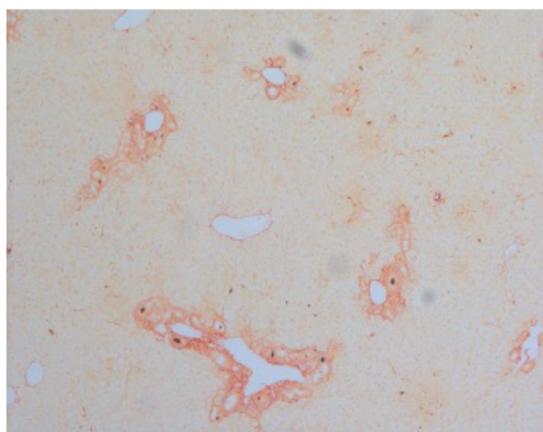
Ove nalaze smo dodatno potvrdili i metodom qPCR kojom nije pronađena značajna razlika u izražavanju gena za *Col1a1* i *Acta2* između pokusne i kontrolne skupine (Slika 5.18.).



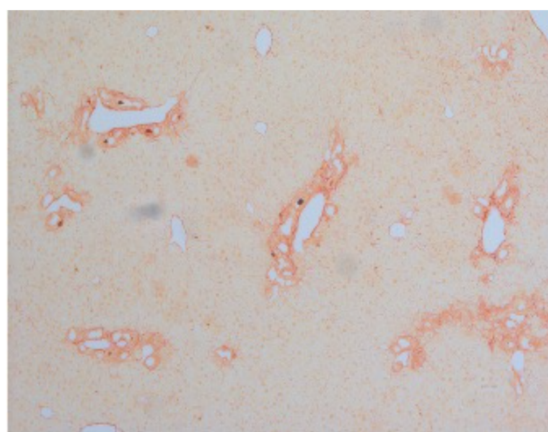
Slika 5.18. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom primjenom CCl₄. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-14

5.3.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC

Iste skupine miševa kao u prethodnom pokusu su tijekom 4 tjedna hranjene hranom s dodatkom spoja DDC, nakon čega su žrtvovane. Uzeti su uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine, kao ni sadržaj hidroksiprolina u jetrenom tkivu nije se značajno razlikovao između kontrolne (Cre^-) i pokusne (Cre^+) skupine (Slika 5.19. i 5.20.). Kao i u prethodnom pokusu ovaj nalaz smo dodatno potvrdili nedostatkom značajne razlike u aktivnosti jetrenih aminotransferaza (Slika 5.21).

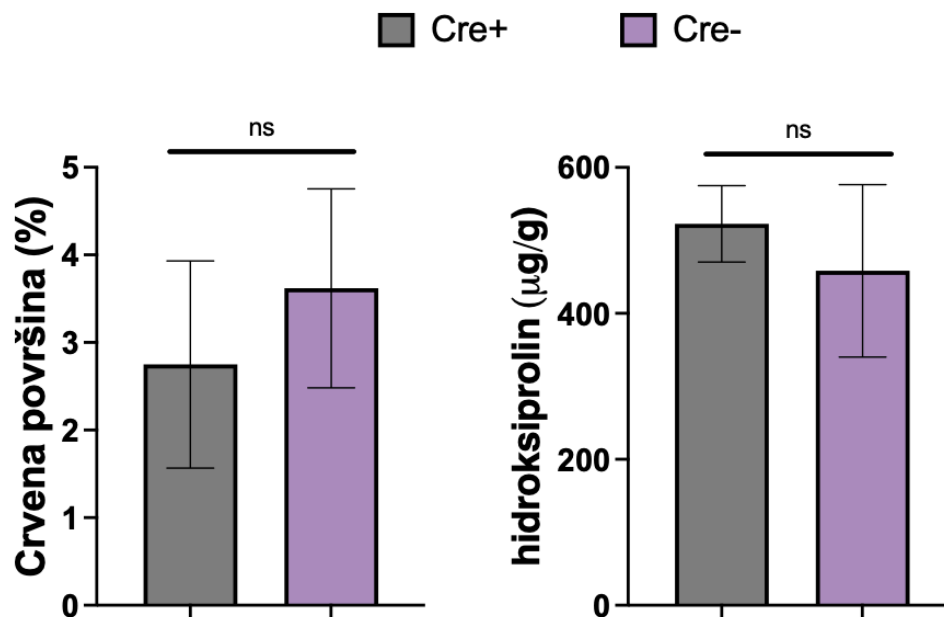


Cre^+

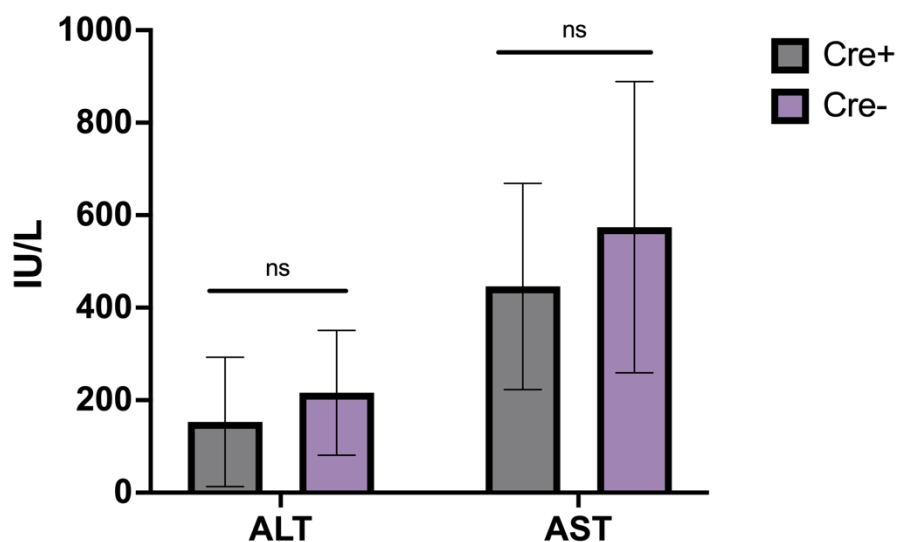


Cre^-

Slika 5.19. Izazivanje fibroze u miševa soja SMACreERT2/RBP-J^{n/n} primjenom prehrane s dodatkom spoja DDC. Miševi su tijekom 4 tjedna uzimali hranu s dodatkom spoja DDC te im je davan tamoksifen, nakon čega su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeve slike predstavljaju pokusnu skupinu (Cre^+), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre^-). Povećanje 100x.



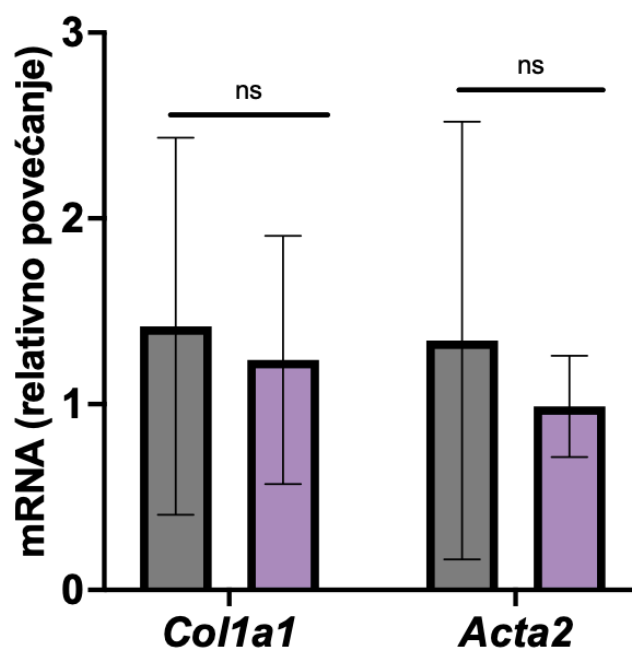
Slika 5.20. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Nije pronađena značajna razlika u postotku crvene površine između pokusne (Cre⁺) i kontrolne (Cre⁻) skupine. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Nije pronađena značajna između pokusne (Cre⁺) i kontrolne (Cre⁻) skupine. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-10



Slika 5.21. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre⁻) i u pokusnoj (Cre⁺) skupini.

Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-10

Analiza izražavanja gena za *Col1a1* i *Acta2*, udruženih s fibrozom jetre, dodatno je potvrdila da obje skupine miševa razvijaju sličan stupanj fibroze jetre jer nije pronađena značajna razlika između pokusne i kontrolne skupine (Slika 5.22.).



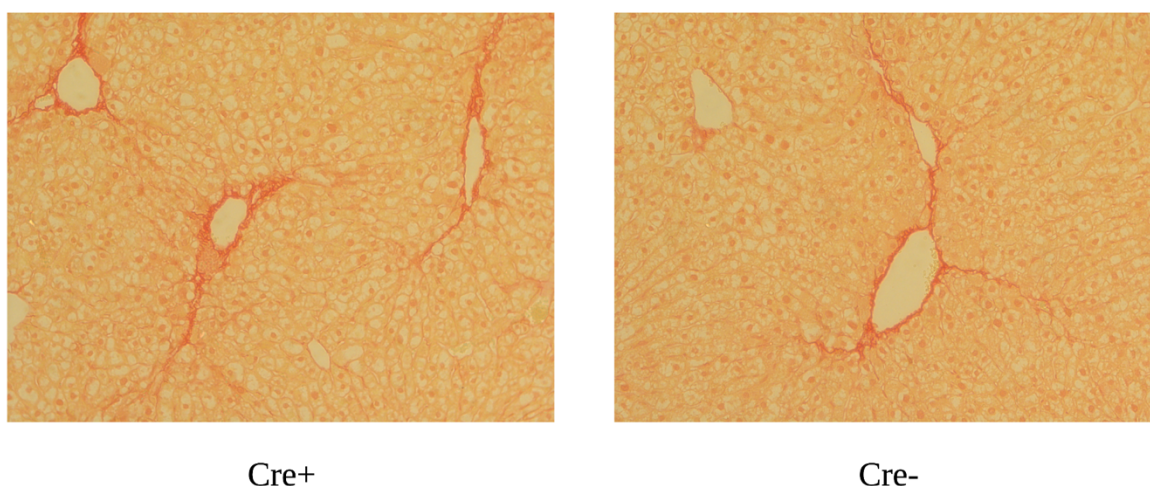
Slika 5.22. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=8-10

5.4. Četvrta faza istraživanja

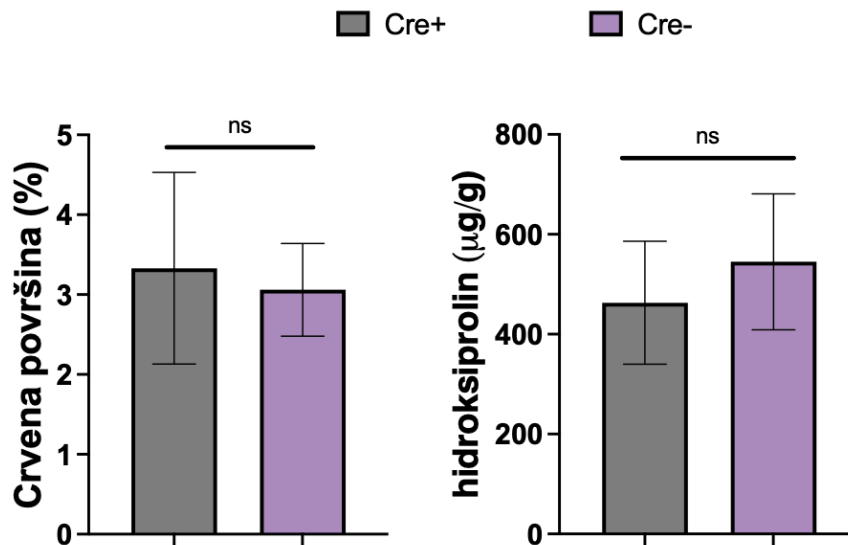
U ovoj fazi istraživanja cilj nam je bio ispitati utjecaj pojačane aktivnosti signalnog puta Notch na razvoj fibroze u modelima fibroze izazvane primjenom ugljikovog tetraklorida i prehranom uz dodatak DDC-a. Korišteni su miševi soja SMACreERT2^{+/+}/Rosa^{NICD1} kojima je uz tretman izazivanja fibroze injiciran tamoksifen kako bi se potaknula aktivacija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC.

5.4.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl₄

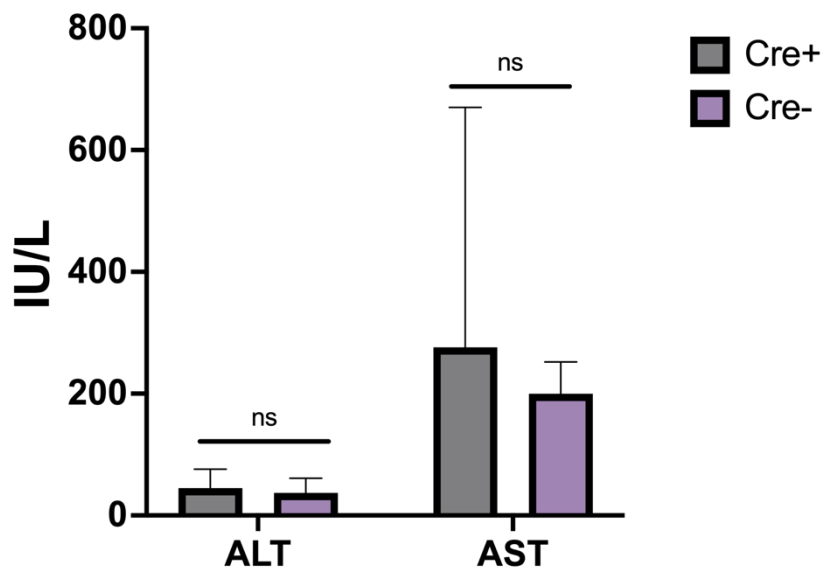
Miševi su tijekom 6 tjedana primali CCl₄ i tamoksifen kako je opisano u metodama, nakon čega su žrtvovani. Pokusnu skupinu činili su miševi soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} koji izražavaju rekombinazu Cre (u daljnjem tekstu Cre⁺), a kontrolnu skupinu miševi iz istog legla koji ne izražavaju rekombinazu Cre (u daljnjem tekstu Cre⁻). Uzeti su uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine nije se značajno razlikovao između kontrolne (Cre⁻) i pokusne (Cre⁺) skupine (Slika 5.23.). U skladu s histološkim nalazom, statistički značajna razlika nije pronađena ni u sadržaju hidroksiprolina (Slika 5.24.) ni u aktivnosti aminotransferaza (Slika 5.25.). Razlike nije bilo ni u izraženosti gena za *Colla1* i *Acta2* povezanih s aktivnošću miofibroblasta (Slika 5.26.)



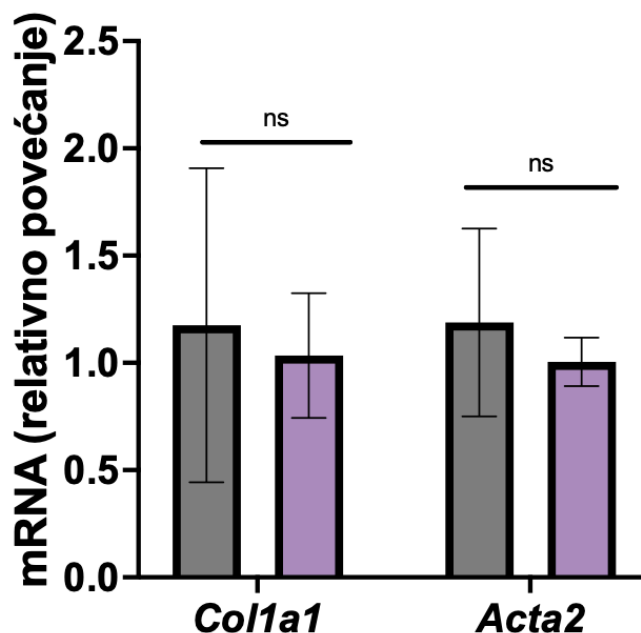
Slika 5.23. Izazivanje fibroze u miševa soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} primjenom CCl₄. Miševi su tijekom 6 tjedana primali CCl₄ i tamoksifen, nakon čega su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeva slika predstavlja pokusnu skupinu (Cre⁺), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre⁻). Povećanje 100x.



Slika 5.24. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=4-12



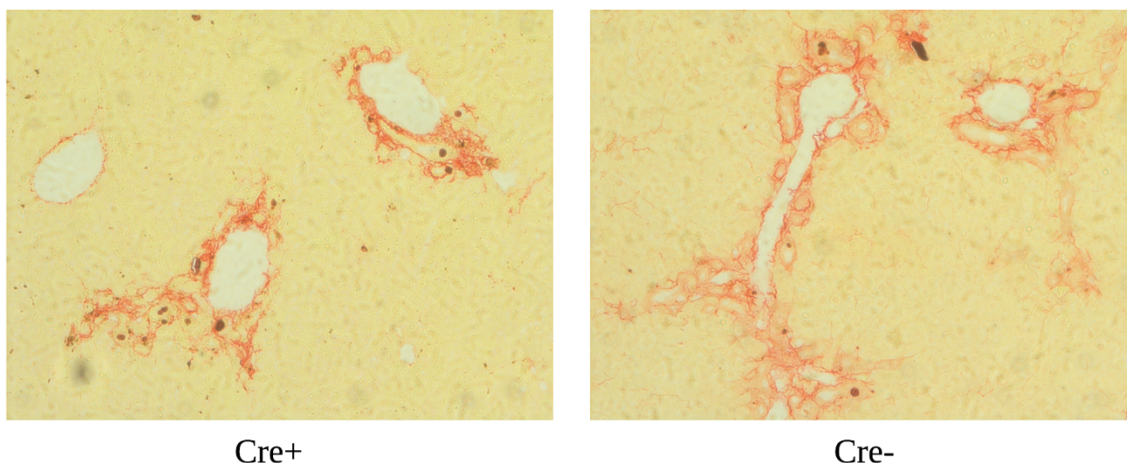
Slika 5.25. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre-) i u pokusnoj (Cre+) skupini. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=4-12



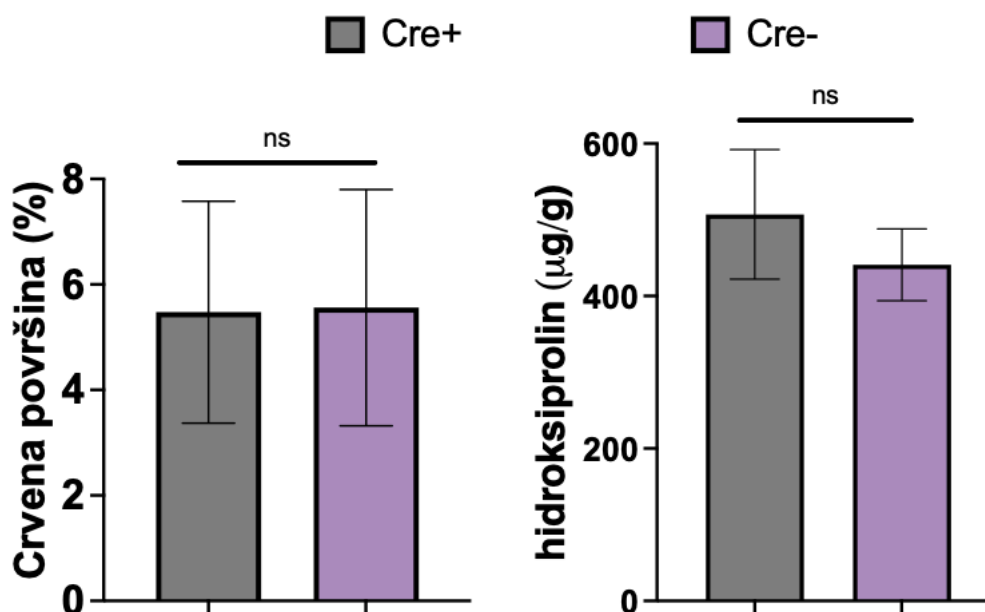
Slika 5.26. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom primjenom CCl₄. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=4-12

5.4.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC

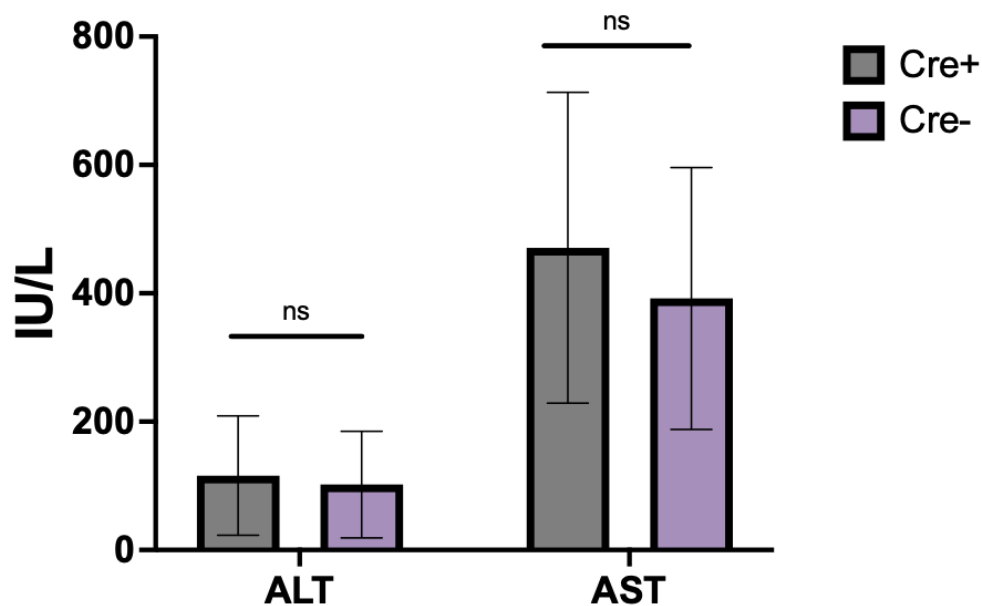
Iste skupine miševa kao u prethodno opisanom pokusu su tijekom 4 tjedna hranjene keksima s dodatkom spoja DDC i tretirane tamoksifenom, nakon čega su miševi žrtvovani. Uzeti su uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću softwarea ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine nije se značajno razlikovao između kontrolne (Cre-) i pokusne (Cre+) skupine (Slika 5.27. i 5.28.). Kao i u prethodnim pokusima sličan stupanj fibroze u skupinama potvrđen je nedostatkom značajne razlike u sadržaju hidroksiprolina (Slika 5.28.), aktivnosti ALT i AST aminotransferaza (5.29.) i izraženosti gena za *Col1a1* i *Acta2* (Slika 5.30.)



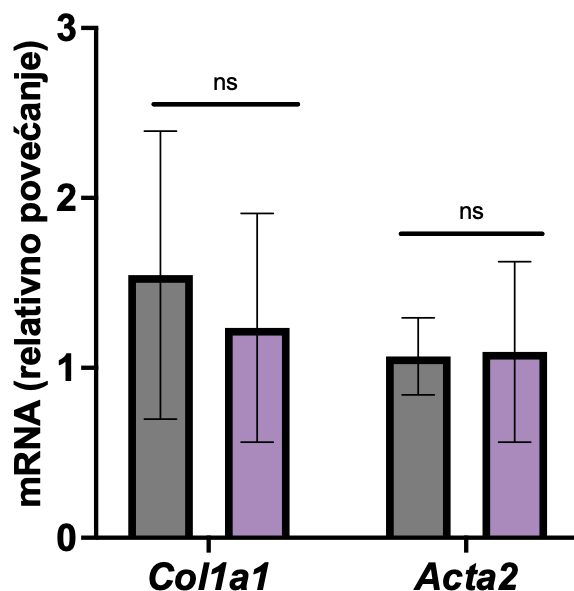
Slika 5.27. Izazivanje fibroze u miševa soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} primjenom prehrane s dodatkom spoja DDC. Miševi su tijekom 4 tjedna uzimali hranu s dodatkom spoja DDC te im je davan tamoksifen, nakon čega su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeva slika predstavlja pokusnu skupinu (Cre⁺), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre⁻). Povećanje 100x.



Slika 5.28. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-8



Slika 5.29. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre⁻) i u pokusnoj (Cre⁺) skupini. Nije pronađena značajna razlika među skupinama ni za ALT ni za AST. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-8

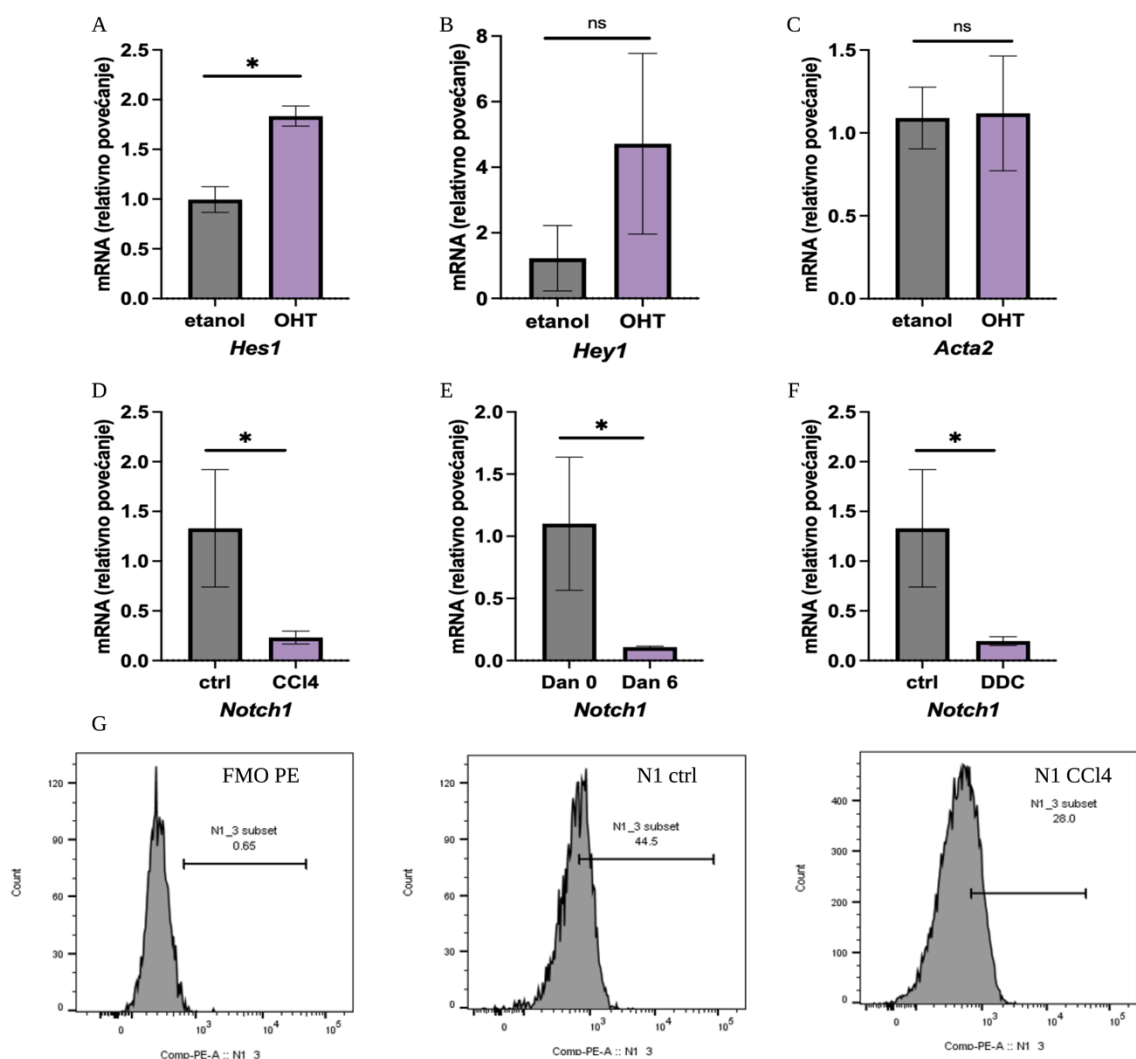


Slika 5.30. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne

devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-8

Ulogu potaknute aktivacije signalnog puta Notch u razvoju fibroze smo dodatno istražili u pokusima *in vitro* na kulturi HSC. Najprije smo pokusom na stanicama miševa soja C57BL/6 i miševima soja SMACreERT2^{-/-}/Rosa^{NICD1} pokazali da jednodnevno dodavanje hidroksitamoksifena u medij na početku kulture ne utječe na izražavanje gena povezanih sa signalnim putem Notch ili aktivacijom HSC (nije prikazano). Na kulturama HSC izoliranih iz SMACreERT2^{+/-}/Rosa^{NICD1} pokazali smo da su kulture tretirane hidroksitamoksifenom imale veću izraženost gena za *Hes1* i *Hey1* od kultura tretiranih vehikulom potvrđujući da rekombinacija posredovana rekombinazom Cre u tim stanicama dovodi do povećane aktivnosti signalnog puta Notch, ali unatoč njegovoj većoj aktivnosti nismo pronašli značajnu razliku u izražavanju gena za *Acta2* povezanog s aktivnošću HSC. (Slika 5.31. A-C).

Dodatno smo željeli istražiti što se događa s izražavanjem receptora Notch1 tijekom aktivacije HSC. Najprije smo u kulturi stanica pokazali da se tijekom diferencijacije HSC u miofibroblaste smanjuje izražavanje gena za *Notch1* (Slika 5.30 D), a nalaz smo potvrdili pokusom *in vivo* u kojem smo pokazali da HSC izolirane iz miševa tretiranih CCl₄ i prehranom s dodatkom spoja DDC manje izražavaju receptor Notch1 u usporedbi sa stanicama izoliranih iz netretiranih miševa (Slika 5.31. E, F – analiza metodom qPCR, Slika 5.31. G – protočnocitometrijska analiza).

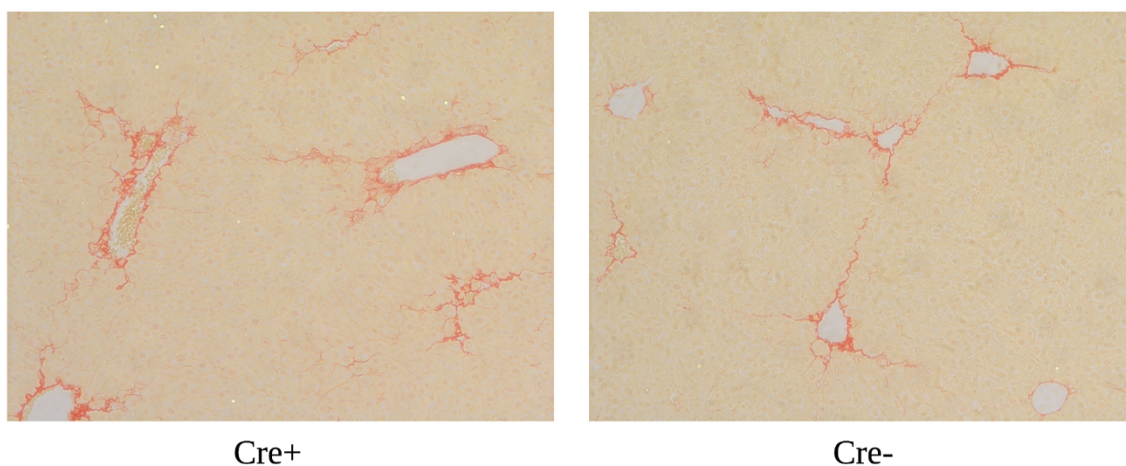


Slika 5.31. Analiza gena povezanih s aktivnošću signalnog puta Notch i aktivacijom HSC i protočnociometrijska analiza izraženosti NOTCH1. A-C HSC su izolirane iz miševa soja SMACreERT2^{+/+}/Rosa^{NICD1}, tijekom prvih 24 sati u kulturu je dodan hidroksitamoksifen (OHT) ili vehikul (etanol). Nakon zamjene medija stanice su rasle u kulturi još 5 dana, izolirana je RNA i određena izraženost gena za **A** *Hes1*, **B** *Hey1* i **C** *Acta2*. **D** analiza izražavanja gena za *Notch1* tijekom aktivacije HSC u kulturi, **E-G** miševi su tretirani 2 tjedna s 4 injekcije CCl₄ ili hranjeni 2 tjedna prehranom uz dodatak spoja DDC, kontrolna skupina je hranjena standardnom hranom i primila je vehikul (kukuruzno ulje) nakon čega su izolirane HSC. **E-F** analiza izraženosti gena za *Notch1*. **G** protočnociometrijska analiza izraženosti NOTCH1. Podatci na grafovima A-F prikazani su u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika, prema engl. *non-significant*; * - $p < 0,05$; ctrl – kontrola (prema engl. *control*); FMO – prema engl. *fluorescence minus one*; PE – fikoeritrin (prema engl. *phycoerythrin*)

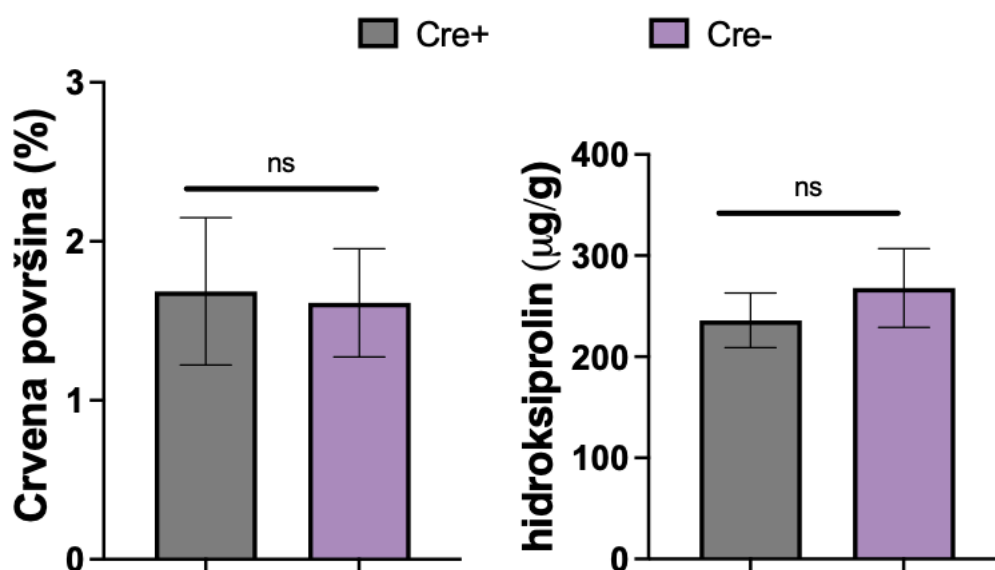
5.4.3. Model aktivacije signalnog puta Notch s oporavkom od tretmana

5.4.3.1. Model fibroze uzrokovane primjenom CCl₄

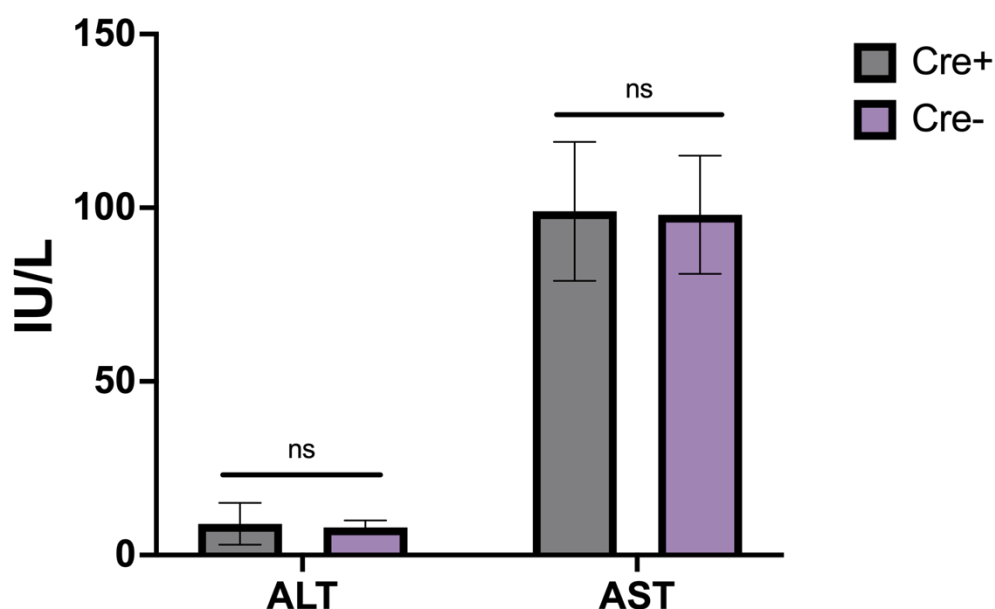
Miševi soja SMACreERT2^{+/-}/Rosa^{NICD1} tretirani su kao u prethodnim pokusima s CCl₄ i tamoksifenom tijekom 3 tjedna te su potom 4 tjedna bili u oporavku od tretmana. Cilj ovog pokusa bio je proučiti oporavljaju li se miševi iz kontrolne skupine (Cre⁻) brže od fibroze u odnosu na miševe iz pokusne skupine kojima je pojačana aktivnost signalnog puta Notch (Cre⁺). Nakon razdoblja oporavka miševi su žrtvovani te su uzeti uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine kao i sadržaj hidroksiprolina bio je manji nego u prethodnim pokusima pokazujući da je došlo do povlačenja fibroze, međutim stupanj oporavka nije se značajno razlikovao između kontrolne (Cre⁻) i pokusne (Cre⁺) skupine (Slika 5.32. i 5.33.). Analiza aktivnosti aminotransferaza pokazala je da su se vrijednosti u obje skupine smanjile na razinu karakterističnu za normalne, netretirane životinje (Slika 5.34.). Jednak stupanj oporavka od fibroze između skupina je dodatno potvrđen qPCR analizom gena za *Colla1* i *Acta2* (Slika 5.35.).



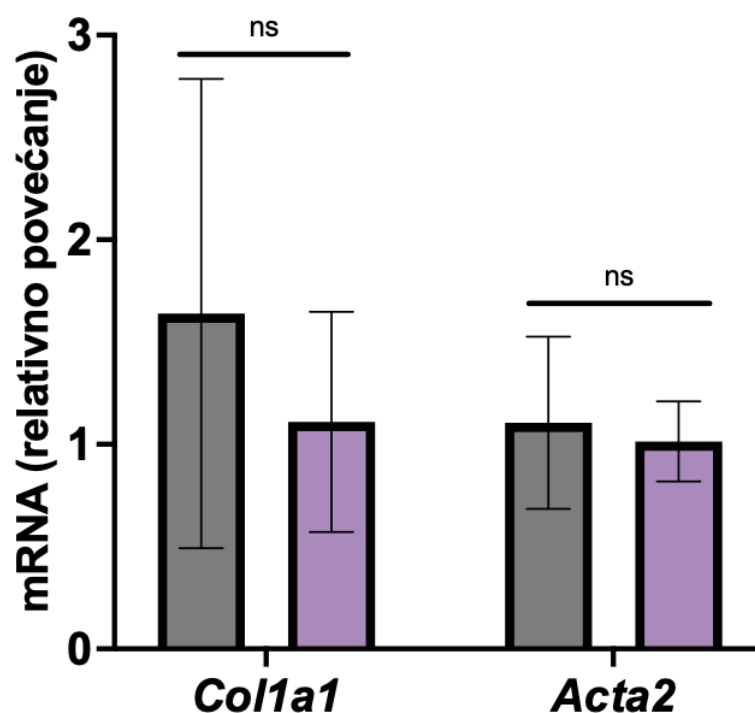
Slika 5.32. Izazivanje fibroze u miševa soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} primjenom CCl₄ s periodom oporavka. Miševi su tijekom 3 tjedna primali CCl₄ i tamoksifen, nakon čega su imali period od 4 tjedna oporavka od tretmana. Potom su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeva slika predstavlja pokusnu skupinu (Cre⁺), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre⁻). Povećanje 100x.



Slika 5.33. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=5-9



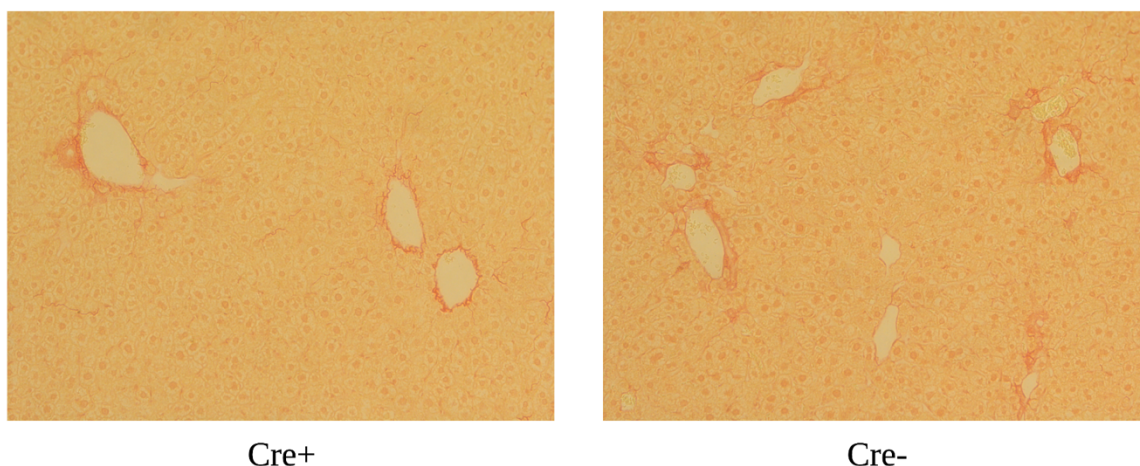
Slika 5.34. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre-) i u pokusnoj (Cre+) skupini. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=5-9



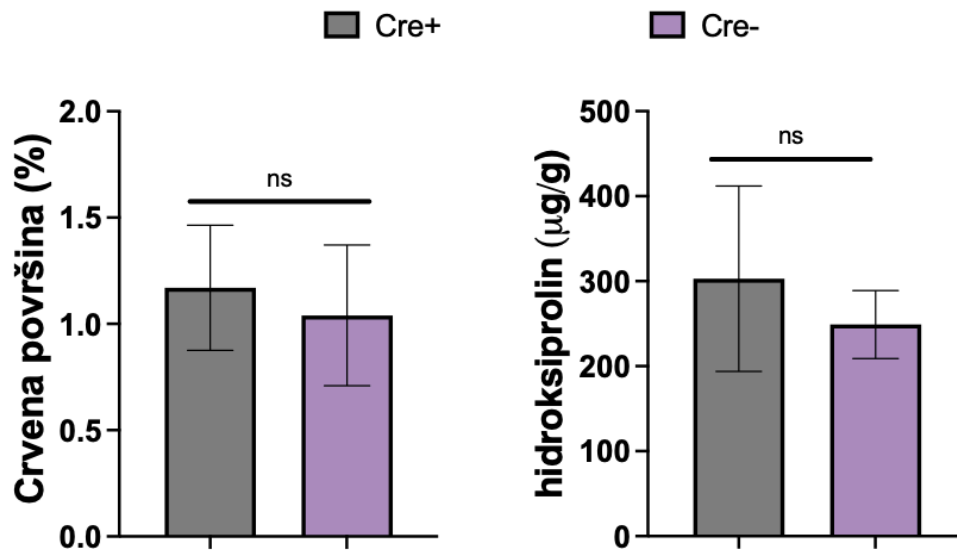
Slika 5.35. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Col1a1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=5-9

5.4.3.2. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC

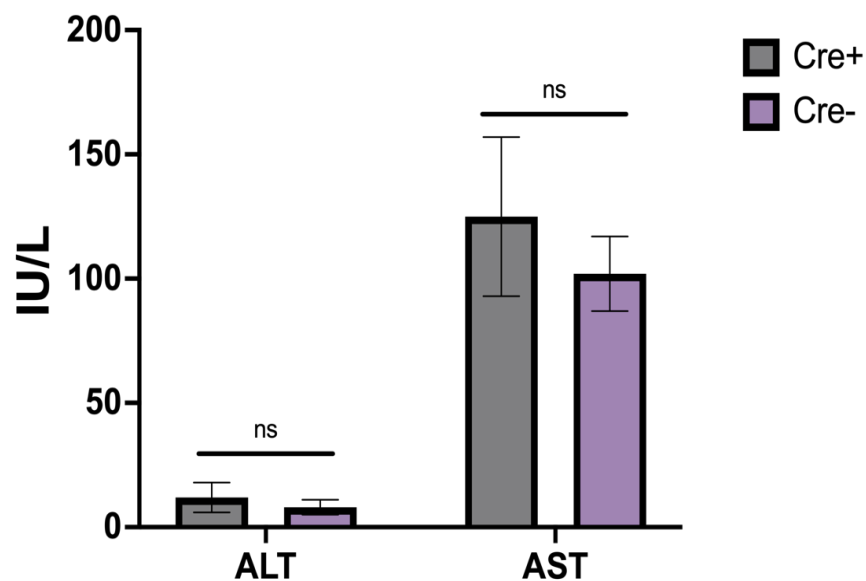
Miševi soja SMACreERT2^{+/-}/Rosa^{NICD1} tretirani su kao u prethodnim pokusima s CCl₄ i tamoksifenom tijekom 2 tjedna te su potom 4 tjedna bili u oporavku od tretmana. Cilj ovog pokusa bio je proučiti oporavljaju li se miševi iz kontrolne skupine (Cre⁻) brže od fibroze u odnosu na miševe iz pokusne skupine kojima je pojačana aktivnost signalnog puta Notch (Cre⁺). Nakon razdoblja oporavka miševi su žrtvovani te su uzeti uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina fotografije koja je obojena crveno (kolagen). Kao i u pokusu oporavka od fibroze izazvane primjenom CCl₄, ni u ovom pokusu nismo našli razliku između skupina u histološkom nalazu, biokemijskim ni genskim analizama (Slika 5.36. -5.39.)



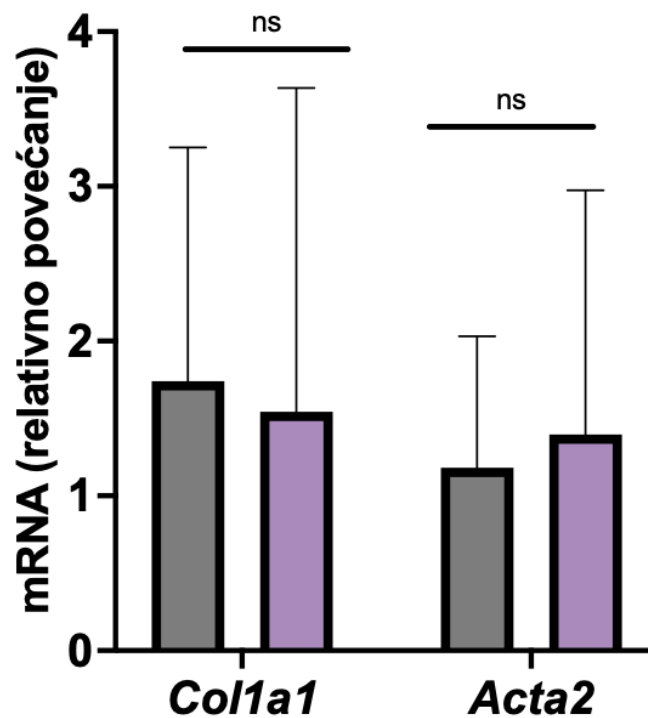
Slika 5.36. Izazivanje fibroze u miševa soja SMACreERT2/Rosa^{NICD1} primjenom prehrane s dodatkom spoja DDC s periodom oporavka. Miševi su tijekom 2 tjedna uzimali hranu s dodatkom spoja DDC te im je davan tamoksifen, nakon čega su imali period od 4 tjedna oporavka od tretmana. Potom su žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red. Lijeva slika predstavlja pokusnu skupinu (Cre⁺), dok desna slika predstavlja kontrolnu skupinu (Cre⁻). Povećanje 100x.



Slika 5.37. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ te udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Lijevi graf prikazuje udio crvene površine, odnosno kolagena, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Desni graf prikazuje udio hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-9



Slika 5.38. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u kontrolnoj (Cre-) i u pokusnoj (Cre+) skupini. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-9



Slika 5.39. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom i aktivnošću HSC u modelu izazvanom prehranom s dodatkom spoja DDC. Analiza metodom qPCR pokazuje izraženost gena za *Colla1*, koji je marker fibroze te *Acta2* koji je marker aktivnosti HSC. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*). Studentov t-test. N=6-9

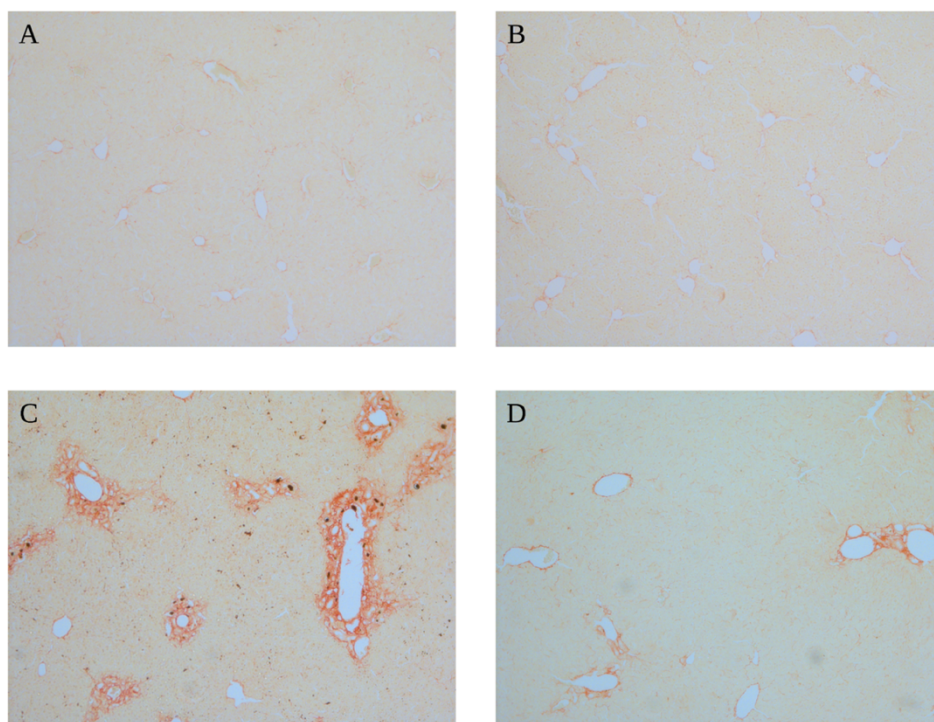
5.5 Peta faza istraživanja

Ukupni zaključak prve četiri faze istraživanja je da modulacija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC nema utjecaj na razvoj jetrene fibroze ni u jednom od istraživanih modela kao ni na proces oporavka od fibroze. Zanimljivo je da je nedavno objavljeno istraživanje u kojem su Yue i sur. uporabom slične metodologije pokazali da inhibicija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC štiti miševe od razvoja fibroze. Usporedbom s našim pokusima zaključili smo da postoji bitna razlika u dizajnu jer Yue i sur. kao kontrolnu skupinu nisu koristili Cre⁻ životinje iz istog legla tretirane tamoksifenom nego Cre⁺ životinje koje su umjesto tamoksifenom tretirali vehikulom.. Pretragom literature ustanovili smo da tamoksifen sam po sebi može imati inhibicijski učinak na HSC pa smo pretpostavili da bi opisani učinak mogao biti posljedica djelovanja tamoksifena, a ne inhibicije signalnog puta Notch. Stoga smo odlučili ispitati može li tretman tamoksifenom smanjiti razvoj fibroze u modelu fibroze izazvane prehranom s dodatkom spoja DDC. U ovoj fazi korišteni su miševi soja C57BL/6.

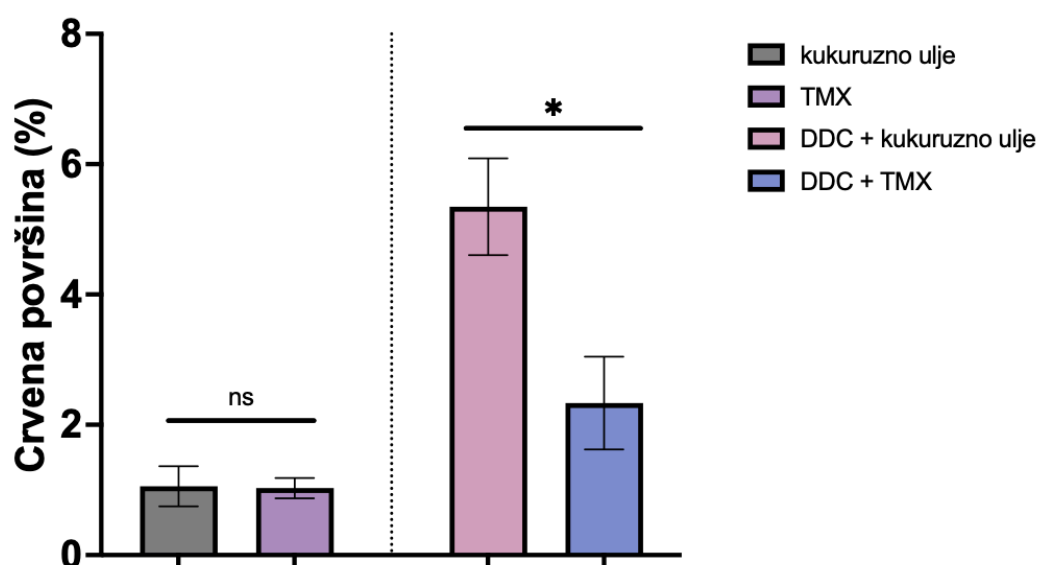
5.5.1. Model fibroze uzrokovane prehranom s dodatkom spoja DDC

Miševi su bili podijeljeni u 4 skupine. Skupinu koja je uzimala standardnu hranu i dobivala kukuruzno ulje, skupinu koja je uzimala standardnu hranu i dobivala tamoksifen, skupinu koja je uzimala hranu s dodatkom spoja DDC i dobivala kukuruzno ulje i skupinu koja je uzimala hranu s dodatkom spoja DDC i dobivala tamoksifen. Postupak je trajao 4 tjedna, nakon čega su miševi žrtvovani, a uzeti su uzorci za histološku, biokemijsku i gensku analizu. Histološke slike analizirane su pomoću programa ImageJ te je izračunata površina slike koja je obojena crveno (kolagen). Postotak crvene površine nije se razlikovao značajno između skupina koje su uzimale standardnu hranu, ali je zato skupina koja je uzimala hranu s dodatkom spoja DDC i dobivala tamoksifen imala značajno manji postotak crvene površine u odnosu na onu koja je uz prehranu s dodatkom spoja DDC dobivala kukuruzno ulje (Slika 5.40. i 5.41.). Jetreno tkivo miševa koji su uz DDC dobivali tamoksifen sadržavalo je u odnosu na skupinu koja je uz DDC dobivala kukuruzno ulje manje hidroksiprolina (Slika 5.42.), imalo je manju aktivnost jetrenih aminotransferaza (Slika 5.43.), te je manje izražavalo gene za *Colla1*, *Acta2* i *Krt19* (Slika 5.44.). Imunohistokemijska analiza pokazala je da sam tamoksifen (uz standardnu prehranu) ne utječe na izražavanje proteina α SMA i KRT19, dok se uz primjenu spoja DDC njihovo

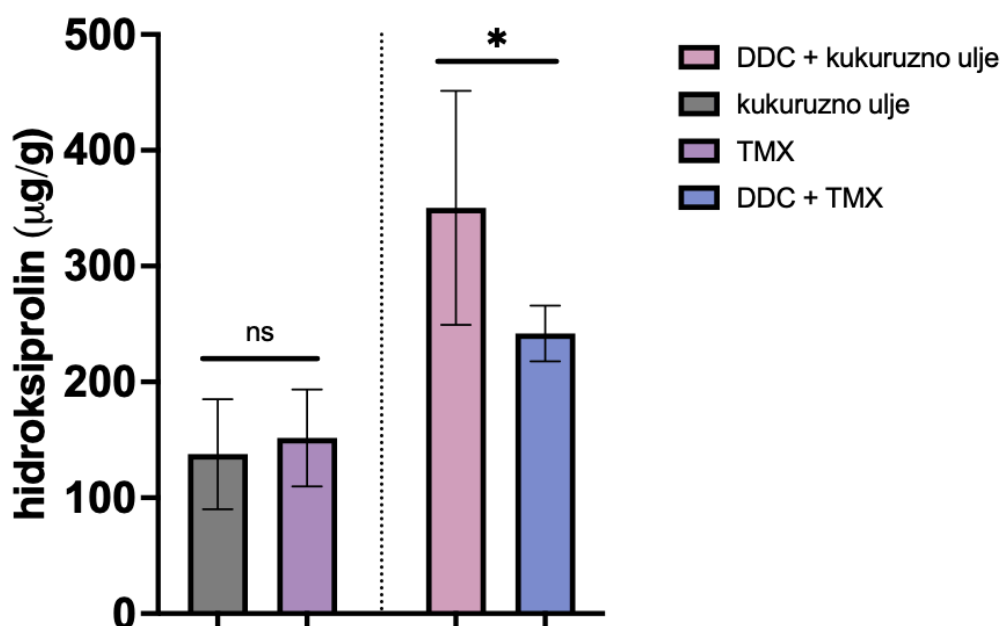
izražavanje smanjuje (Slika 5.45.). Nadalje, primjena tamoksifena uz standardnu prehranu uzrokovala je značajno povećanje izražavanja gena za *Il6* i *Tgfb*. Slične rezultate dobili smo i na miševima ženskog spola (nije prikazano) te tako isključili mogućnost da je antifibrotički učinak tamoksifena ovisan o spolu.



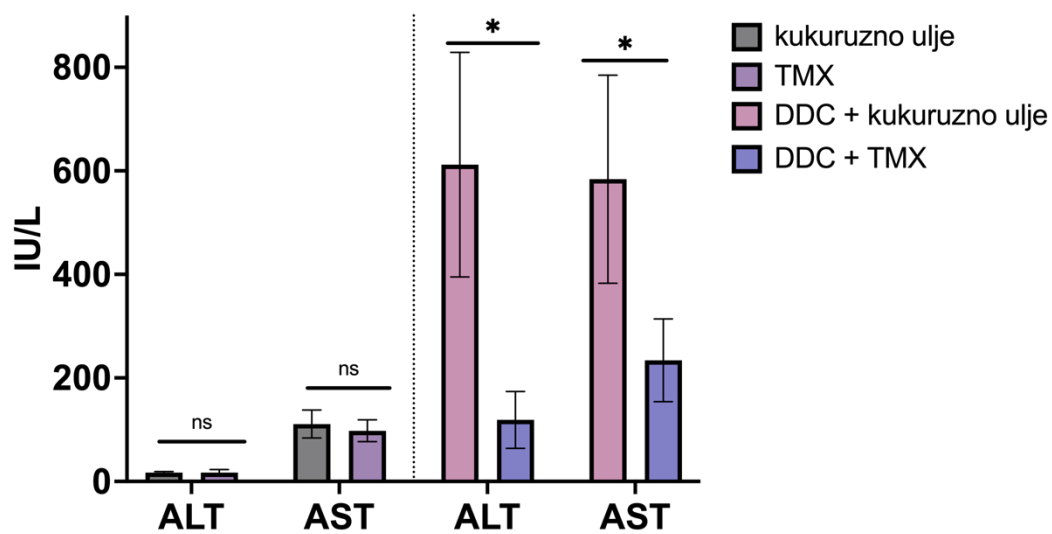
Slika 5.40. Izazivanje fibroze u miševa soja C57BL/6 primjenom prehrane s dodatkom spoja DDC. Gornji red predstavlja slike jetrenog tkiva miševa skupina koje su bile na standardnoj prehrani i dobivale kukuruzno ulje (A) ili tamoksifen (B). Donji red predstavlja slike jetrenog tkiva miševa skupina koje su bile na prehrani s dodatkom DDC-a i dobivale kukuruzno ulje (C) ili tamoksifen (D). Postupak je trajao 4 tjedna, miševi su potom žrtvovani, a jetreno tkivo obojano je metodom Sirius red kojom se kolagen boji crveno. Povećanje 100x.



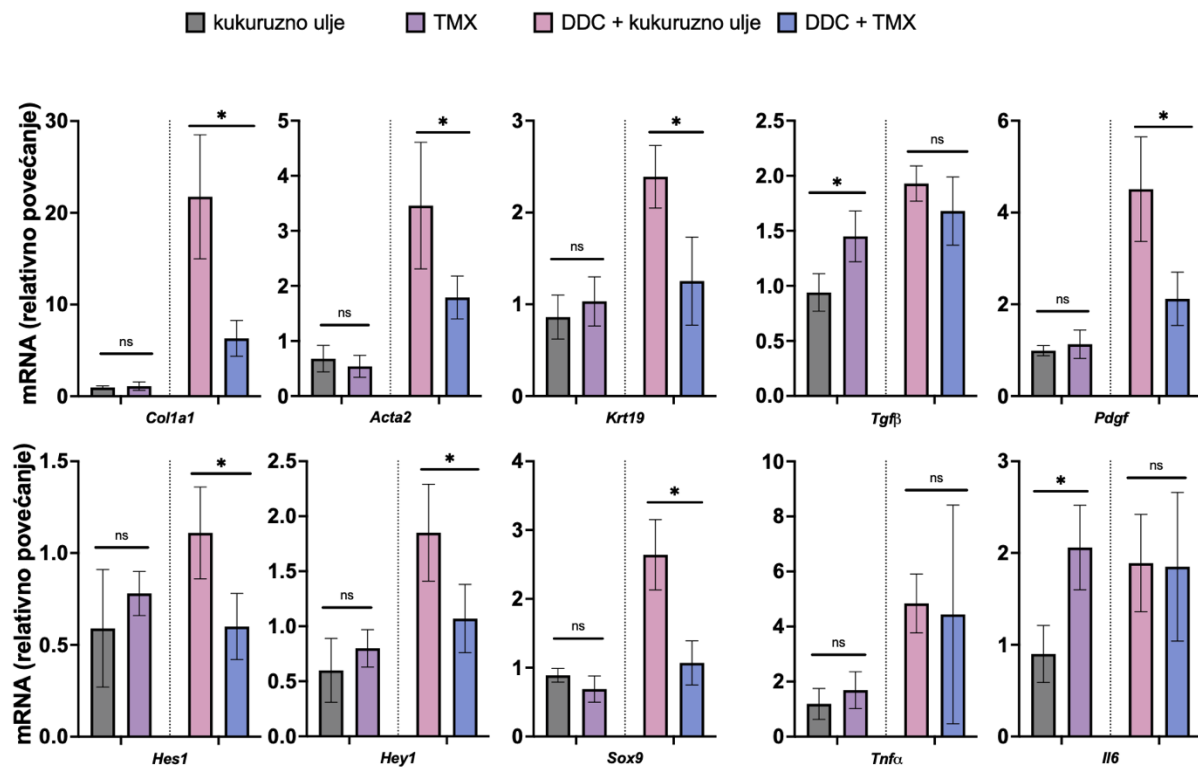
Slika 5.41. Kvantifikacija stupnja fibroze pomoću programa ImageJ. Graf prikazuje postotak preparata prekriven crvenom površinom, odnosno koliki udio tkiva predstavlja kolagen, koji se metodom Sirius red boji crveno, kako je izračunato pomoću programa za analizu ImageJ. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika, prema engl. *non-significant*; * označava $p < 0,05$. Studentov t-test. N=4-7



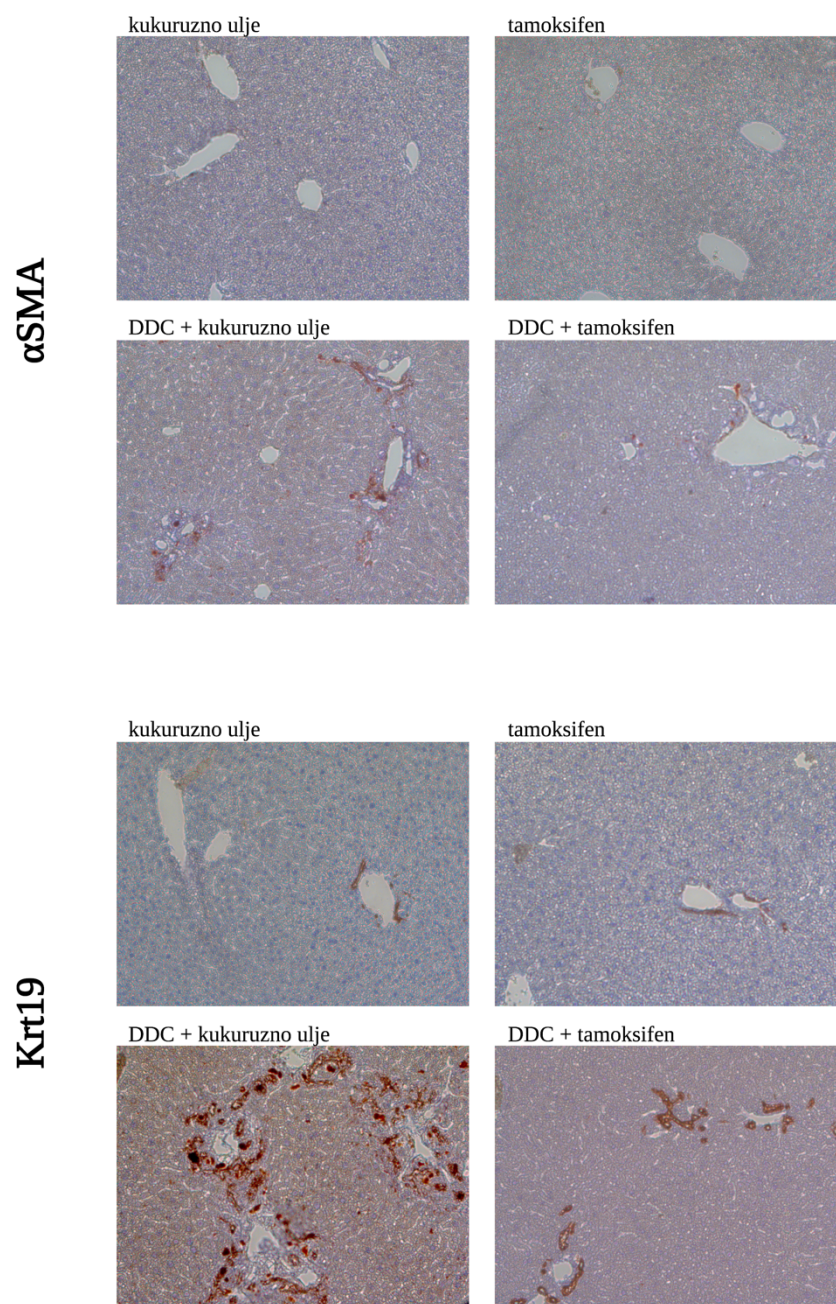
Slika 5.42. Kvantifikacija udjela hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Miševi u pokusu bili su raspodijeljeni u 4 skupine. Dva stupca lijevo predstavljaju skupine koje su uz standardnu prehranu primale kukuruzno ulje ili tamoksifen. Desna dva stupca predstavljaju skupine koje su uz prehranu s dodatkom spoja DDC primale kukuruzno ulje ili tamoksifen. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. ns – nije pronađena značajna razlika, prema engl. *non-significant*; * označava $p < 0,05$. Studentov t-test. N=4-7



Slika 5.43. Serumska aktivnost jetrenih aminotransferaza. Graf prikazuje serumske vrijednosti alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) u sve 4 skupine miševa. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije. TMX – tamoksifen (prema engl. *tamoxifen*) ns – nije pronađena značajna razlika (prema engl. *non-significant*); * označava $p < 0,05$. Studentov t-test. N=4-7



Slika 5.44. Analiza izraženosti gena povezanih s fibrozom, aktivnošću jetrenih zvjezdolikih stanica, upalnih gena i gena vezanih uz signalni put Notch metodom qPCR. Podatci su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije, a predstavljaju relativno povećanje mRNA u odnosu na kontrolu. Studentov t-test. ns – nije pronađena značajna razlika; * - $p < 0,05$. TMX – tamoksifen (prema engl. *tamoxifen*). N=4-7



Slika 5.45. Analiza izraženosti proteina α SMA i KRT19. Miševi su bili raspodijeljeni u 4 skupine. Dvije skupine su bile na standardnoj prehrani i tretirane ili kukuruznim uljem ili tamoksifenom, a dvije su bile na prehrani s dodatkom spoja DDC i također tretirane kukuruznim uljem ili tamoksifenom. Jetrena tkiva miševa na standardnoj prehrani slabo izražavaju proteine α SMA i KRT19 bez obzira na tretman. Jetreno tkivo miševa koji su uzimali hranu s dodatkom spoja DDC i bili tretirani kukuruznim uljem, pojačano je izražavalo α SMA i KRT19, dok je ih je tkivo miševa tretiranih tamoksifenom izražavalo značajno manje. Povećanje 100x.

6. Rasprava

Cilj ovog doktorskog rada bio je okarakterizirati učinak modulacije signalnog puta Notch u HSC na razvoj jetrene fibroze. U tu svrhu korištena su dva modela fibroze, primjena CCl₄ (toksični model) i prehrana s dodatkom spoja DDC (kolestatski model) na transgeničnim miševima u kojima se signalni put Notch može selektivno inhibirati ili aktivirati u stanicama koje izražavaju α SMA primjenom tamoksifena.

6.1. Signalni put Notch aktiviran je u patogenezi jetrene fibroze

Cilj prve faze istraživanja bio je uspostaviti modele jetrene fibroze na miševima soja C57BL/6 te usporediti izraženost gena povezanih s fibrozom (*Colla1*), aktivnošću HSC (*Acta2*) i signalnim putem Notch u kontrolnoj i pokusnoj skupini. Tijekom 6 tjedana trajanja protokola u modelu s CCl₄, kao i 4 tjedna protokola u modelu sa spojem DDC, tkivo jetre progresivno je postajalo sve fibroznije, što je pokazano histološki, bojenjem Sirius red, kao i biokemijski, mjerenjem udjela hidroksiprolina u jetrenom tkivu. Oštećenje jetre pokazano je i povišenom serumskom aktivnošću jetrenih aminotransferaza. Na nivou genske izraženosti, u oba modela je značajno pojačana izraženost gena *Colla1* i *Acta2*, što ukazuje na aktivaciju HSC i pojačano stvaranje kolagena. Do pojačanog izražavanja gena povezanih sa signalnim putem Notch došlo je u oba modela, ali smo ipak primijetili neke razlike. U modelu s CCl₄, u pokusnoj skupini značajno je porasla izraženost gena za *Notch3*, *Hey1*, *HeyL* i *Jag2*, a u modelu prehrane sa spojem DDC otkrili smo pojačanu izraženost gena za *Hes1*, *Hey1*, *HeyL*, *Notch2*, *Notch3*, *Jag1* i *Jag2*. Jedini gen kod kojeg je pri razvoju fibroze došlo do smanjenja izraženosti je gen za *Hes1* u modelu s CCl₄. Pretragom literature nismo pronašli istraživanja koja su do sad sistematski istraživala izraženost gena signalnog puta Notch u modelu prehrane s dodatkom spoja DDC, a u modelu fibroze uzrokovane primjenom CCl₄, naši su rezultati u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja. Ta istraživanja pokazala su pojačanu izraženost *Notch3*. Isto tako, kao i u našem istraživanju, izraženost *Notch1* i *Notch2* nije se značajno razlikovala među skupinama. Ono u čemu se naše istraživanje razlikuje od dosadašnjih je značajno manja izraženost gena *Hes1* u pokusnoj u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su dosadašnja istraživanja pokazala njegovu pojačanu izraženost u pokusnoj skupini. Izražaj gena za *Hes1* je pod kompleksnom kontrolom i osim aktivacije signalnog puta Notch izraženost mu mogu

modulirati i razni drugi čimbenici poput TGF- β , Ikaros, TNF- α i drugi (54-56). Zanimljivo je da su Zhang i suradnici u istraživanju aktivacije HSC pokazali da se izraženost gena za *Hes1* smanjuje sa stupnjem aktivacije i njihovom pretvorbom u miofibroblaste što je u skladu s našim rezultatima (57). Dakle, regulacija *Hes1* nije pod isključivim nadzorom signalnog puta Notch, a razlika između različitih istraživanja mogla bi nastati i zbog različitog udjela pojedinih vrsta stanica u jetrenom tkivu. Zaključno, kao i rezultati prethodnih studija, naši rezultati ukazuju na aktivaciju signalnog puta Notch u jetrenom tkivu tijekom razvoja jetrene fibroze. Također, u istraživanjima koja su proučavala izraženost gena signalnog puta Notch u uzorcima ljudskog tkiva dobivenog biopsijom jetre pokazana je povećana izraženost različitih molekula signalnog puta Notch u fibrotičnim uzorcima različite etiologije (58, 59).

6.2. Stanice koje su bazalno pozitivne na α SMA ne diferenciraju se u znatnoj mjeri u miofibroblaste tijekom razvoja jetrene fibroze u istraživanim modelima

Cilj druge faze istraživanja bio je odrediti koje stanice u najvećem udjelu doprinose populaciji miofibroblasta tijekom razvoja jetrene fibroze, one koje bazalno izražavaju α SMA (perivaskularne stanice glatkog mišića, mezenhimske prethodničke stanice) ili je to dominantno svojstvo aktiviranih jetrenih zvjezdolikih stanica. Dosad objavljena istraživanja imala su oprečne nalaze. Dok neka istraživanja tvrde da dominantni izvor miofibroblasta ovisi o etiologiji fibroze, Mederacke i sur. proveli su istraživanje u kojem su na transgeničnim životinjama pratili diferencijaciju stanica i pokazali da su aktivirane HSC glavni izvor miofibroblasta bez obzira na etiologiju fibroze. U svojem istraživanju koristili su transgenike u kojima je izražavanje fluorescentnog biljega bilo pod promotorskim nadzorom gena za *Lrat* za kojeg su prethodno pokazali da je visokospecifičan za HSC. Ipak s obzirom na to da su korišteni transgenici u kojima je izražavanje fluorescentnog biljega pod konstitutivnim nadzorom gena za *Lrat* ostala je neistražena mogućnost da se populacija mezenhimskih prethodničkih stanica pozitivnih na α SMA nakon ozljede jetre najprije diferencira u stanice pozitivne na LRAT, a zatim u miofibroblaste. (11, 13). Uporaba transgeničnih sojeva kod kojih je izražavanje fluorescentnog biljega inducibilno, to jest, može se izazvati u određenoj

vremenskoj točki primjenom tamoksifena i pratiti u označenoj stanici i njenom potomstvu, omogućila nam je da detaljnije istražimo ovu mogućnost.

U našim pokusima, primijenili smo dva različita postupka primjene tamoksifena za svaki od modela fibroze. U prvom postupku tamoksifen smo primijenili prije uvođenja tretmana CCl₄ ili spojem DDC, a u drugom postupku tamoksifen smo primijenili nakon početka tretmana. Primijenivši tamoksifen prije izazivanja fibroze, označene su stanice koje bazalno izražavaju α SMA. Prateći biljeg tdTomato, koji ostaje u stanicama nastalim umnažanjem stanica koje bazalno izražavaju α SMA, na kraju postupka broj stanica koje su ga izražavale nije se značajno promijenio. Za razliku od toga, kada smo tamoksifen primijenili nakon CCl₄ ili spoja DDC, označene su i stanice koje su počele izražavati α SMA kao odgovor na fibrogeni čimbenik (aktivirane HSC) te se njihov broj povećavao kako je postupak tekao. Ovi rezultati navode na zaključak da u fibrozi ne dolazi do umnažanja stanica koje bazalno izražavaju α SMA (mezenhimskih progenitora i perivaskularnih stanica) te da glavni izvor miofibroblasta pozitivnih na α SMA moraju biti stanice koje prije izazivanja fibroze ne izražavaju α SMA, a u skladu s dosadašnjim spoznajama to su HSC (11). Analizom izoliranih jetrenih stanica pokazali smo da su HSC zaista pozitivne na fluorescentni biljeg tdTomato i da se u kulturi stanica diferenciraju u miofibroblaste pozitivne na tdTomato. Pokazali smo i da po primjeni tamoksifena do rekombinacije posredovane rekombinazom Cre i izražavanja biljega tdTomato dolazi u 40-60% HSC što odgovara podacima iz literature (60).

6.3. Inhibicija transkripcijskog čimbenika Rbpjk u stanicama koje izražavaju α SMA ne dovodi do blažeg razvoja fibroze u istraživanim modelima jetrene fibroze

Cilj treće faze istraživanja bio je okarakterizirati učinak inhibicije ključnog transkripcijskog čimbenika signalnog puta Notch, RBPJK, na razvoj fibroze. Hipoteza je bila da će njegova inhibicija u stanicama koje izražavaju α SMA dovesti do razvoja blažeg oblika fibroze u odnosu na miševu u kojih on nije inhibiran. Dosadašnja istraživanja na životinjskim modelima potvrdila su da inhibicija signalnog puta Notch dovodi do blažeg oblika jetrene fibroze. Međutim, u tim istraživanjima korišteni su inhibitori γ -sekretaze, enzima ključnog za provođenje signala u signalnom putu Notch. Nedostatak tih pokusa je taj što su inhibitori γ -sekretaze neselektivni te blokiraju sve signalne puteve nizvodno od γ -sekretaze. Također, s

obzirom na to da su receptori i ligandi signalnog puta Notch izraženi na brojnim drugim stanicama, prije svega makrofazima, u kojima signalni put Notch ima ulogu u polarizaciji između M1 fenotipa, koji je fibrogen, i M2 fenotipa, koji je fibrolitički, ovim pristupom nije moguće utvrditi kako inhibicija Notcha u pojedinim staničnim populacijama djeluje na razvoj fibroze. Također, jedno istraživanje je pokazalo da inhibicija RBPJ κ korištenjem „decoy“ oligodeoksinukleotida dovodi do smanjene fibroze u modelu jetrene fibroze uzrokovane primjenom spoja DDC. Nedostatak ovog istraživanja je također neselektivna inhibicija RBPJ κ , odnosno intravenska primjena oligodeoksinukleotida, stoga nije moguće zaključiti koliko inhibicija RBPJ κ u pojedinim stanicama doprinosi smanjenju fibroze (61).

U našim pokusima nismo pronašli značajnu razliku između skupine kojoj je inhibiran signalni put Notch u stanicama pozitivnim na α SMA i kontrolne skupine u stupnju fibroze određenom histološkim i biokemijskim analizama, kao ni na razini genske izraženosti ni u jednom od dva primijenjena životinjska modela. Iz toga smo zaključili da selektivna inhibicija transkripcijskog čimbenika RBPJ κ u stanicama koje izražavaju α SMA ne ublažava razvoj fibroze. Zanimljivo je međutim da je u nedavnom istraživanju koje su proveli Yue i sur. pokazano da inhibicija signalnog puta Notch u miofibroblastima modulira progresiju i regresiju fibroze. Oni su, koristeći mišveve soja Sm22 α^{CreER} -RBPJ^{flox/flox}, inhibirali signalni put specifično u miofibroblastima. U pokusima na miševima soja C57BL/6 pokazali su imunohistokemijskim bojenjem i analizom metodom qPCR da s progresijom fibroze, signalni put Notch postaje aktivniji, dok se njenom regresijom njegova aktivnost smanjuje. U pokusima u kojima su izazvali inhibiciju RBPJ κ u miofibroblastima, navode manji stupanj fibroze u odnosu na kontrolnu skupinu u modelu fibroze izazvene primjenom CCl₄. Moguće je da je razlika u odnosu na naše rezultate nastala kao posljedica nešto drukčijeg soja miševa koje su koristili ili nešto drukčijeg režima primjene CCl₄ odnosno tamoksifena. Međutim, detaljnijim čitanjem njihovog rada, primijetili smo mogućnost da bi diskrepancija u rezultatima mogla biti posljedica drukčije kontrolne skupine koju su koristili. Naime, za kontrolu su koristili mišveve soja Sm22 α^{CreER} koje su tretirali vehikulom (maslinovim uljem), a ne poput nas Cre negativne mišveve tretirane tamoksifenom (62). Nedostatak je što za razliku od našeg istraživanja ne isključuje moguće učinke tamoksifena za kojeg je niz istraživanja pokazalo da nije inertan i da može imati antifibrotičan učinak. Zato pretpostavljamo da bi razlika u rezultatima mogla biti posljedica učinka tamoksifena, a ovu pretpostavku dodatno smo

potkrijepili pokusima u kojima smo pokazali da primjena tamoksifena smanjuje razvoj fibroze u modelu fibroze uzrokovane primjenom spoja DDC.

6.4. Aktivacija signalnog puta Notch1 u stanicama koje izražavaju α SMA ne dovodi do jače fibroze u proučavanim modelima jetrene fibroze

Cilj četvrte faze istraživanja bio je okarakterizirati učinak aktivacije signalnog puta Notch1 u stanicama koje izražavaju α SMA na razvoj fibroze. Hipoteza je bila da njegova pojačana aktivacija u stanicama koje izražavaju α SMA uzrokuje nastanak jačeg oblika fibroze u odnosu na kontrolu. Istraživanje koje su proveli Zhu i sur. pokazalo je da pojačana aktivacija signalnog puta Notch1 u hepatocitima doprinosi pogoršanju fibroze u mišjem modelu steatohepatitisa. Također, u istom radu su pokazali da aktivacija NOTCH1 u hepatocitima uzrokuje pojačanu upalu u jetri, pojačano izražavanje fibrogenih gena te pojačano odlaganje kolagena čak i u odsustvu tkivne ozljede. Ovo istraživanje pokazalo je da je aktivacija NOTCH1 u hepatocitima dovoljna da pokrene aktivaciju HSC i proces fibroze, čak i u odsustvu steatoze ili oštećenja hepatocita (49). U našim pokusima nismo pronašli značajnu razliku između pokusne i kontrolne skupine ni histološki, ni biokemijski, kao ni na razini genske izraženosti, ni u jednom od dva primijenjena modela jetrene fibroze, iz čega smo zaključili da selektivna aktivacija signalnog puta Notch1 u stanicama koje izražavaju α SMA neće dovesti do razvoja jače fibroze u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na to da se početna hipoteza o aktivaciji signalnog puta Notch1 pokazala netočnom, odlučili smo napraviti set pokusa u kojem smo životinjama dopustili oporavak od fibroze u trajanju od 4 tjedna. U ovom slučaju hipoteza je bila da će se miševi u kojima je signalni put Notch1 aktiviran u stanicama koje izražavaju α SMA sporije oporavljati od fibroze u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno da je inaktivacija signalnog puta Notch nužna za deaktivaciju HSC pri oporavku od fibroze. Međutim, ni u ovom setu pokusa nije pronađena značajna razlika među skupinama. Rezultate smo dodatno potvrdili pokusima *in vitro* na kulturama primarnih HSC.

Ukupni zaključak našeg istraživanja je da modulacija signalnog puta Notch u aktiviranim jetrenim zvjezdolikim stanicama nema utjecaja na razvoj ni na povlačenje jetrene fibroze. Prema dosadašnjim spoznajama aktivacija signalnog puta Notch ima važnu ulogu u razvoju jetrene fibroze, ali čini se da je taj učinak posredovan učincima na druge jetrene stanice poput hepatocita i makrofaga (50, 61). U našem istraživanju koristili smo transgenične miševe u

kojima se aktivnost signalnog puta Notch može selektivno modulirati nakon primjene tamoksifena. Osim brojnih prednosti koje ima ovaj pristup postoje i određena ograničenja. Jedno od ograničenja je da nakon primjene tamoksifena do rekombinacije posredovane rekombinazom Cre ne dolazi u svim stanicama s odgovarajućim promotorom. Prema analizi HSC pozitivnih na biljeg tdTomato, do rekombinacije dolazi u približno 50% stanica što odgovara podacima iz literature. Donocoff i sur. istraživali su različite režime primjene tamoksifena, ali bez obzira na optimizaciju protokola nisu uspjeli postići rekombinaciju posredovanu rekombinazom Cre u znatno većem postotku (60). Uporabom transgeničnih sojeva u kojima do aktivacije rekombinaze Cre dolazi konstitutivno postigao bi se veći postotak modulacije, ali bi ona bila prisutna od početka razvoja pa bi translacijski potencijal istraživanja bio znatno manji jer bi postojala mogućnost da su promjene posljedica promijenjenog razvoja stanica, a zaključci bi se mogli donositi samo o preventivnom, ne i o terapijskom potencijalu. Nadalje, aktivnost signalnog puta Notch u našim transgeničnim sojevima modulira se preko receptora NOTCH1 za kojeg smo pokazali da mu se izražaj u HSC tijekom njihove aktivacije i diferencijacije smanjuje u pokusima *in vitro* i *in vivo* (57). U budućim istraživanjima potrebno je istražiti mogući utjecaj modulacije signalnog puta Notch preko drugih receptora. Kao što smo već spomenuli, u nedavno objavljenom istraživanju Yue i suradnici su u istraživanju sličnom našem dobili smanjenje fibroze, pritom ne procjenjujući mogućnost antifibrotskog učinka samog tamoksifena (62). Stoga smo u završnoj fazi istraživanja istražili može li tamoksifen imati utjecaja na ishod fibroze jetre u modelu fibroze uzrokovane primjenom spoja DDC.

6.5. Tamoksifen pokazuje zaštitnu ulogu u kolestatskom (DDC) modelu jetrene fibroze

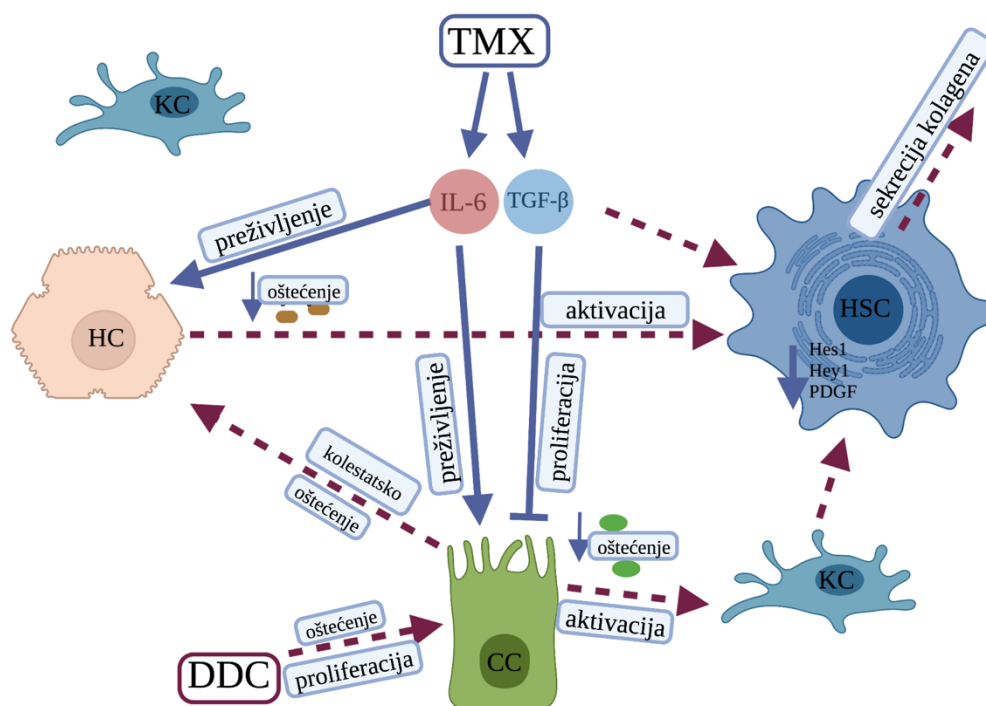
U nedavnom istraživanju koje je provedeno *in vitro*, pokazano je da tamoksifen mehanički deaktivira HSC, što ukazuje na to da bi mogao imati antifibrotski učinak (64). Također su provedeni i pokusi *in vivo*, ali na toksičnom modelu ugljikovog tetraklorida. U svom istraživanju provedenom na štakorima, Kulcsar i sur. opisali su zaštitni učinak tamoksifena na fibrozu uzrokovanu CCl₄, dok su Xu i sur. opisali suprotan učinak (63, 65). Razni pokusi na miševima također su opisali potencijalnu zaštitnu ulogu tamoksifena u modelu akutnog

jetrenog zatajenja uzrokovano LPS-om, kao i u modelu steatoze i nealkoholnog steatohepatitisa (66, 67).

S obzirom na ove rezultate, kao i na rezultate prethodnih faza našeg istraživanja, odlučili smo napraviti pokus u kojem ćemo okarakterizirati učinak samog tamoksifena na razvoj jetrene fibroze, a budući da su pokusi na toksičnom modelu već izvođeni, mi smo se odlučili napraviti pokus na kolestatskom modelu. Za ove pokuse korišteni su ponovno miševi soja C57BL/6. Svi markeri fibroze (histološki, biokemijski, genski) bili su slabije izraženi u skupini koja je bila na prehrani s dodatkom spoja DDC, a tretirana je tamoksifenom u odnosu na skupinu koja je tretirana kukuruznim uljem. Sam tamoksifen, u kombinaciji sa standardnom prehranom, nije imao utjecaja na jetrenu histologiju, sadržaj hidroksiprolina ni serumsku aktivnost aminotransferaza, što dovodi do zaključka da tamoksifen sam po sebi nema toksičan ili fibrogeni učinak.

Na genskoj razini, sam tamoksifen doveo je do pojačanog izražavanja *Tgfb* i *Il6*, dok je izraženost svih ostalih istraživanih gena bila slična onoj u kontrolnoj skupini. Pojačano izražavanje *Tgfb* nakon tretmana tamoksifenom u životinja na standardnoj prehrani u skladu je s rezultatima drugih istraživanja o učinku tamoksifena na druge organe (mliječne žlijezde, pluća, aorta) (68-70). S obzirom na to da je dobro opisano da je TGFβ jedan od važnih čimbenika koji pridonose aktivaciji jetrenih zvjezdolikih stanica, ovaj učinak čini se kontradiktoran (71). Međutim, zaštitni učinak TGF-β je nedavno opisan u modelu podvezivanja žučovoda (72). Također je opisano, isto tako u DDC modelu, da gubitak TGFβ specifično u epitelnim stanicama ne pridonosi fibrozi, ali zato štiti miševе od razvoja kolangiokarcinoma putem inhibicije proliferacije kolangiocita (73). S obzirom na to da je proliferacija kolangiocita važan patogenetski mehanizam za fibrozu potaknutu DDC-om, upravo ovim putem tamoksifen može iskazivati svoj zaštitni učinak. Slično kao za TGFβ, izražavanj *Il6* je također bilo pojačano u životinja koje su uz standardnu prehranu primale tamoksifen. Dosad je opisan fibrogeni učinak IL-6 u jetri i drugim organima (74), međutim u kolestatskoj fibrozi se čini da on ima zaštitnu ulogu. Dva istraživanja su pokazala da inhibicija signalnog puta IL-6 inaktivacijom Stat3 u hepatocitima i kolangiocitima dovodi do pogoršanja fibroze u dva različita modela, transgeničnim miševima soja *mdr^{-/-}*, kao i u modelu fibroze uzrokovane primjenom spoja DDC (75, 76). Za primijetiti je da u našem istraživanju nije bilo značajne razlike u izraženosti ova dva gena među skupinama koje su bile na prehrani s dodatkom spoja DDC. Pretpostavljamo da je u skupini koja je primala samo kukuruzno ulje,

porast izražavanja uzrokovan spojem DDC, a u skupini koja je primala tamoksifen, porast je bio neočekivano visok za stupanj fibroze pa pretpostavljamo da je u tih miševa porast izražavanja bio posredovan i spojem DDC i tamoksifenom. Sve skupa, naša hipoteza je da je zaštitni učinak tamoksifena u kolestatskoj fibrozi posredovan pojačanim izražavanjem *Tgfβ* i *Il6* te smatramo da bi ovi signalni putevi trebali biti primarni fokus daljnjih istraživanja. Pretpostavljeni mehanizam učinaka tamoksifena shematski je prikazan na slici 6.1 (Slika 6.1).



Slika 6.1. Predloženi mehanizam zaštitnog učinka tamoksifena u kolestatskoj fibrozi. Tretman tamoksifenom dovodi do pojačanog izražavanja TGF-β, jednog od glavnih aktivacijskih signala za HSC, međutim to je onemogućeno zbog inhibicijskog učinka na proliferaciju kolangiocita, koja je ključna za kolestatsku fibrozu. Nadalje, pojačano izražavanje IL-6 potiče preživljenje i hepatocita i kolangiocita, čime se umanjuje fibrogeni učinak aktiviranih Kupfferovih stanica i HSC. Tgfβ - *transforming growth factor β*, Pdgf - *platelet-derived growth factor*, Il6 - *interleukin 6*, Hes1 - *hes family bhlh transcription factor 1*, Hey1 - *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1*, TMX – tamoksifen (prema engl. *tamoxifen*), DDC - 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidrokolidin; KC - Kupfferova stanica; HSC – jetrena zvjezdolika stanica; HC - hepatocit; CC - kolangiocit. Shema dizajnirana na BioRender.com.

Učinak tamoksifena je često ovisan o spolu. Istraživanja su opisala učinak ovisan o spolu u modelu tolerancije glukoze, kao i u modelu bubrežne fibroze uzrokovane unilateralnom

opstrukcijom uretera (77, 78). Stoga smo isti set pokusa odlučili napraviti i na ženka miševa C57BL/6. Zaštitni učinak tamoksifena na razvoj fibroze bio je sličan u oba spola, što znači da tamoksifen ima zaštitnu ulogu u kolestatskoj fibrozi neovisno o spolu. Ipak, određene razlike među mužjacima i ženka bile su prisutne pa je tako izraženost gena *Hes1* i *Hey1* bila nešto niža u mužjaka u odnosu na ženke, a izraženost *Tnfa* bila je snižena samo u ženki (53). S obzirom na široku primjenu tamoksifena u temeljnim istraživanjima (aktivacija rekombinaze Cre u brojnim životinjskim modelima bolesti), potrebno je osigurati da sam tamoksifen nema interakciju s proučavanim mehanizmom bolesti, kako ne bi došlo do pogrešnih rezultata i interpretacija. U proučavanju jetrene fibroze koristi se visok broj injekcija tamoksifena kako bi se osigurala indukcija Cre rekombinaze u aktiviranim HSC. Naši rezultati ukazuju na moguću interakciju tamoksifena s učincima posredovanim IL-6 i TGF β , što ukazuje na potrebu za pažljivim dizajnom pokusa, kao i tumačenjem dobivenih rezultata. U našim pokusima koristili smo nižu dozu tamoksifena (75 μ g/g), onu koja se uglavnom koristi za aktivaciju rekombinaze Cre te se ona pokazala sigurnom, odnosno nije imala toksičan učinak. Učinkovitost i toksičnost tamoksifena je različito opisana u literaturi te se čini da je ovisna o soju. Istraživanja su pokazala da su doza koju smo mi koristili pa čak i više doze, sigurne, odnosno nisu izazvale toksičan učinak u miševa soja C57BL/6 (79, 80), dok su u određenih transgeničnih sojeva čak i niže doze imale toksičan učinak (81). Kako bi se dalje ispitao translacijski potencijal primjene tamoksifena u jetrenoj fibrozi, potrebno je svakako napraviti dodatna ispitivanja koja bi uključivala ispitivanje učinkovitosti različitih doza i puteva primjene.

Rezultati ove faze istraživanja pokazali su da tamoksifen ima antifibrotični učinak u modelu fibroze uzrokovane primjenom spoja DDC i da primjena tamoksifena može mijenjati izraženost različitih gena važnih u razvoju fibroze. Stoga je u ovakvim istraživanjima nužno i kontrolnu skupinu tretirati tamoksifenom kao što je učinjeno u našem istraživanju kako bi se izbjegli pogrešni zaključci (53).

7. ZAKLJUČCI

1. Signalni put Notch induciran je tijekom razvoja jetrene fibroze u jetrenom tkivu u oba istraživana modela, toksičnom modelu primjene ugljikovog tetraklorida i kolestatskom modelu prehrane s dodatkom DDC-a.
2. HSC su glavni izvor miofibroblasta u jetrenoj fibrozi uzrokovanoj ugljikovim tetrakloridom i prehranom s dodatkom DDC-a. Stanice koje su bazalno pozitivne na α SMA ne diferenciraju se u znatnoj mjeri u miofibroblaste niti u jednom od istraživanih modela.
3. Inhibicija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC tijekom razvoja fibroze ne smanjuje opseg fibroze u modelu fibroze uzrokovane primjenom ugljikovog tetraklorida, kao ni u kolestatskom modelu prehrane s dodatkom spoja DDC.
4. Pojačana aktivacija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC ne povećava opseg fibroze u modelu fibroze uzrokovane primjenom ugljikovog tetraklorida, kao ni u kolestatskom modelu prehrane s dodatkom spoja DDC.
5. Pojačana aktivacija signalnog puta Notch u aktiviranim HSC nema utjecaja na povlačenje fibroze nakon prestanka fibrogenog podražaja ugljikovim tetrakloridom ili spojem DDC.
6. Tamoksifen štiti od razvoja kolestatske fibroze. Mogući mehanizam putem kojeg tamoksifen ostvaruje ovaj učinak je inhibicija proliferacije kolangiocita putem TGF- β i IL-6 te bi oni trebali biti fokus daljnjih istraživanja.
7. Djelovanje tamoksifena na razvoj jetrene fibroze treba uzeti u obzir prilikom planiranja pokusa koji uključuju transgenične inducibilne sojeve, odabira modela jetrene fibroze, kao i prilikom tumačenja rezultata.

8. SAŽETAK

U ovom radu istražili smo kako modulacija signalnog puta Notch u aktiviranim jetrenim zvjezdolikim stanicama (aHSC) utječe na razvoj fibroze koristeći dva životinjska modela, toksični model primjene CCl₄ i kolestatski model prehrane s dodatkom spoja DDC. Pokazali smo da je signalni put Notch induciran tijekom razvoja fibroze. Zatim smo na transgeničnim miševima soja SMACreERT2^{+/-}/Ai9 pokazali da se stanice koje bazalno izražavaju αSMA ne umnožavaju tijekom fibroze te da su glavni izvor miofibroblasta HSC. Pokusima na miševima soja SMACreERT2^{+/-}/RBP-J^{fl/fl} i SMACreERT2^{+/-}/Rosa^{NICD1} pokazali smo da inhibicija ili pojačana aktivacija signalnog puta Notch u aHSC ne utječe na stupanj fibroze. Nadalje, pokazali smo da u miševa s pojačanom aktivnošću signalnog puta Notch dolazi do normalnog oporavka od fibroze po prestanku fibrogenog poticaja. U nedavno objavljenom sličnom istraživanju pokazano je da inhibicija signalnog puta Notch smanjuje razvoj fibroze, ali ono nije procijenilo mogućnost antifibrotičkog učinka samog tamoksifena. Stoga smo u završnoj fazi istraživanja istražili može li tamoksifen imati utjecaja na ishod fibroze jetre u kolestatskom modelu. Pokazali smo da tamoksifen ima antifibrotični učinak u kolestatskom modelu, a naša hipoteza je da je zaštitni učinak tamoksifena posredovan pojačanim izražavanjem *Tgfb* i *Il6* te smatramo da bi ovi signalni putevi trebali biti fokus daljnjih istraživanja.

9. SUMMARY

The role of Notch signaling pathway in hepatic stellate cells in development of murine model of liver fibrosis

Dino Šisl, 2022

We aimed to investigate how Notch signaling pathway modulation (inhibition and overactivation) affects the development of liver fibrosis. In the first experiment we have shown that Notch signaling pathway is induced in two fibrosis models, CCl₄ application and DDC-supplemented feeding. Further, by using transgenic SMACreERT2^{+/-}/Ai9 mice, we have shown that constitutionally α SMA-positive cells do not multiply during fibrosis and that the main source of α SMA-positive myofibroblasts must be hepatic stellate cells. By using SMACreERT2^{+/-}/RBP-J^{fl/fl} and SMACreERT2^{+/-}/Rosa^{NICD1} mice we have shown that neither Notch inhibition nor its overactivation in activated hepatic stellate cells affects the degree of liver fibrosis. Furthermore, Notch overactivation had no effect on resolution of liver fibrosis once the fibrogenic stimulus was removed. A recently published article with a methodology similar to ours reported a lesser extent of fibrosis with Notch inhibition, but the possibility of confounding effect of tamoxifen remained open. Therefore, we decided to investigate whether tamoxifen itself affects fibrosis development in the DDC-model. Our results show that tamoxifen indeed has a protective role in the DDC-model and we hypothesize that the protective effect of tamoxifen might be mediated through *Il6* and *Tgfb* upregulation, suggesting these pathways as a primary focus for further research.

10. POPIS LITERATURE

1. Chen Y, Zheng S, Qi D, Zheng S, Guo J, Zhang S, i sur. Inhibition of Notch signaling by a γ -secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. PLoS One. 2012;7(10):e46512.
2. Sitia G, Aiolfi R, Di Lucia P, Mainetti M, Fiocchi A, Mingozi F, i sur. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(32):E2165-72.
3. Friedman SL. Pathogenesis of hepatic fibrosis [Internet]. U: UpToDate, Post TW ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2022 [pristupljeno 9.3.2022.] Dostupno na: <http://www.uptodate.com>
4. Goldberg E, Chopra S. Cirrhosis in adults: Etiologies, clinical manifestations, and diagnosis U: UpToDate, Post TW ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2022 [pristupljeno 9.3.2022..] Dostupno na: <http://www.uptodate.com>
5. Bansal R, van Baarlen J, Storm G, Prakash J. The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis. Sci Rep. 2015;5:18272.
6. Xu J, Chi F, Guo T, Punj V, Lee WN, French SW, i sur. NOTCH reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation. J Clin Invest. 2015;125(4):1579-90.
7. Campana L, Iredale JP. Regression of Liver Fibrosis. Semin Liver Dis. 2017;37(1):1-10.
8. Luo N, Li J, Wei Y, Lu J, Dong R. Hepatic Stellate Cell: A Double-Edged Sword in the Liver. Physiol Res. 2021;70(6):821-9.
9. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, i sur. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. J Hepatol. 2006;45(3):429-38.
10. Matsuda M, Seki E. The liver fibrosis niche: Novel insights into the interplay between fibrosis-composing mesenchymal cells, immune cells, endothelial cells, and extracellular matrix. Food Chem Toxicol. 2020;143:111556.
11. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, i sur. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. Nat Commun. 2013;4:2823.

12. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, i sur. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3297-305.
13. Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, i sur. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*. 2016;90(5):1025-48.
14. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, i sur. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102(3):538-49.
15. Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;175:71-102.
16. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
17. Heinrichs D, Berres ML, Nellen A, Fischer P, Scholten D, Trautwein C, i sur. The chemokine CCL3 promotes experimental liver fibrosis in mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e66106.
18. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, i sur. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*. 2007;178(8):5288-95.
19. Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, i sur. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology*. 2012;55(6):1965-75.
20. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*. 2003;37(1):87-95.
21. Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134(1):248-58.
22. Jeong WI, Park O, Suh YG, Byun JS, Park SY, Choi E, i sur. Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon- γ) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2011;53(4):1342-51.

23. Glässner A, Eisenhardt M, Krämer B, Körner C, Coenen M, Sauerbruch T, i sur. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest.* 2012;92(7):967-77.
24. Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, Choi SS, Karaca G, Krüger L, i sur. Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2380-94.
25. Zhang M, Serna-Salas S, Damba T, Borghesan M, Demaria M, Moshage H. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech Ageing Dev.* 2021;199:111572.
26. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, i sur. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(4):1073-83.e22.
27. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, i sur. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 2008;134(4):657-67.
28. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, i sur. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(24):9448-53.
29. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):427-37.
30. Fickert P, Stöger U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, i sur. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 2007;171(2):525-36.
31. Walkin L, Herrick SE, Summers A, Brenchley PE, Hoff CM, Korstanje R, i sur. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6(1):18.
32. Truong HN, Nguyen HN, Nguyen TKN, Le MH, Tran HG, Huynh N, i sur. Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research. *Biomedical Research and Therapy.* 2014;1(2):9.
33. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10663-8.

34. Hillebrandt S, Goos C, Matern S, Lammert F. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus *Hfib1* on chromosome 15. *Gastroenterology*. 2002;123(6):2041-51.
35. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26(2):99-109.
36. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2017;7(1):1-12.
37. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*. 2018;34(4):147-59.
38. Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, et al. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14559-63.
39. Rockey DC, Weymouth N, Shi Z. Smooth muscle α actin (*Acta2*) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One*. 2013;8(10):e77166.
40. Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1235-94.
41. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-33.
42. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):95.
43. Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, Radtke F, Weinmaster G, Iruela-Arispe ML. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. *Development*. 2010;137(23):4061-72.
44. McCright B, Lozier J, Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: *Notch2* as a genetic modifier of *Jag1* haploinsufficiency. *Development*. 2002;129(4):1075-82.
45. Tanimizu N, Miyajima A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 15):3165-74.
46. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*. 2009;136(10):1727-39.

47. Fiorotto R, Raizner A, Morell CM, Torsello B, Scirpo R, Fabris L, i sur. Notch signaling regulates tubular morphogenesis during repair from biliary damage in mice. *J Hepatol.* 2013;59(1):124-30.
48. Zhu C, Kim K, Wang X, Bartolome A, Salomao M, Dongiovanni P, i sur. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Transl Med.* 2018;10(468).
49. Dufton NP, Peghaire CR, Osuna-Almagro L, Raimondi C, Kalna V, Chauhan A, i sur. Dynamic regulation of canonical TGF β signalling by endothelial transcription factor ERG protects from liver fibrogenesis. *Nat Commun.* 2017;8(1):895.
50. Thompson MD, Moghe A, Cornuet P, Marino R, Tian J, Wang P, i sur. β -Catenin regulation of farnesoid X receptor signaling and bile acid metabolism during murine cholestasis. *Hepatology.* 2018;67(3):955-71.
51. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc.* 2015;10(2):305-15.
52. Park YJ, An HT, Park JS, Park O, Duh AJ, Kim K, i sur. Tyrosine kinase inhibitor neratinib attenuates liver fibrosis by targeting activated hepatic stellate cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):14756.
53. Šisl D, Flegar D, Filipović M, Turčić P, Planinić P, Šućur A, i sur. Tamoxifen Ameliorates Cholestatic Liver Fibrosis in Mice: Upregulation of TGF β and IL6 Is a Potential Protective Mechanism. *Biomedicines.* 2022;10(5).
54. Karin M. The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res.* 2008;18(3):334-42.
55. Kathrein KL, Chari S, Winandy S. Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10476-84.
56. Jeziorska DM, Koentges G, Vance KW. Novel cis-regulatory modules control expression of the Hairy and Enhancer of Split-1 (HES1) transcription factor in myoblasts. *J Biol Chem.* 2012;287(8):5687-97.
57. Zhang K, Zhang YQ, Ai WB, Hu QT, Zhang QJ, Wan LY, i sur. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling. *World J Gastroenterol.* 2015;21(3):878-87.

58. Valenti L, Mendoza RM, Rametta R, Maggioni M, Kitajewski C, Shawber CJ, i sur. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes*. 2013;62(12):4052-62.
59. Geisler F, Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology*. 2015;61(1):382-92.
60. Donocoff RS, Teteloshvili N, Chung H, Shoulson R, Creusot RJ. Optimization of tamoxifen-induced Cre activity and its effect on immune cell populations. *Sci Rep*. 2020;10(1):15244.
61. Lee SJ, Kim KH, Pak SC, Kang YN, Yoon GS, Park KK. Notch signaling affects biliary fibrosis via transcriptional regulation of RBP-jk in an animal model of chronic liver disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):12688-97.
62. Yue Z, Jiang Z, Ruan B, Duan J, Song P, Liu J, i sur. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression. *Int J Biol Sci*. 2021;17(9):2135-46.
63. Kulcsár A, Kulcsár-Gergely J. Effects of tamoxifen and levonorgestrel treatment on carbon tetrachloride induced alterations in rats. *Arzneimittelforschung*. 1991;41(12):1298-301.
64. Cortes E, Lachowski D, Rice A, Thorpe SD, Robinson B, Yeldag G, i sur. Tamoxifen mechanically deactivates hepatic stellate cells via the G protein-coupled estrogen receptor. *Oncogene*. 2019;38(16):2910-22.
65. Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, i sur. Estrogen reduces CCL4-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. 2002;8(5):883-7.
66. Gong X, Cao P, Liu L, Lin Y, Yang Q, Zhou L, i sur. Tamoxifen Prevents D-galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Murine Acute Hepatic Failure through Inhibition of Oxidative Stress and Mmd-2 Upregulation. *Immunol Invest*. 2018;47(6):547-57.
67. Miyashita T, Toyoda Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Hepatoprotective effect of tamoxifen on steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in mouse models. *J Toxicol Sci*. 2012;37(5):931-42.
68. Koli KM, Ramsey TT, Ko Y, Dugger TC, Brattain MG, Arteaga CL. Blockade of transforming growth factor-beta signaling does not abrogate antiestrogen-induced growth inhibition of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1997;272(13):8296-302.

69. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med.* 1995;1(10):1067-73.
70. Bentzen SM, Skoczylas JZ, Overgaard M, Overgaard J. Radiotherapy-related lung fibrosis enhanced by tamoxifen. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(13):918-22.
71. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells.* 2019;8(11).
72. Qian J, Jiao Y, Wang G, Liu H, Cao X, Yang H. Mechanism of TGF- β 1 inhibiting Kupffer cell immune responses in cholestatic cirrhosis. *Exp Ther Med.* 2020;20(2):1541-9.
73. Mu X, Pradere JP, Affò S, Dapito DH, Friedman R, Lefkovitch JH, i sur. Epithelial Transforming Growth Factor- β Signaling Does Not Contribute to Liver Fibrosis but Protects Mice From Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology.* 2016;150(3):720-33.
74. Xiang DM, Sun W, Ning BF, Zhou TF, Li XF, Zhong W, i sur. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. *Gut.* 2018;67(9):1704-15.
75. Mair M, Zollner G, Schneller D, Musteanu M, Fickert P, Gumhold J, i sur. Signal transducer and activator of transcription 3 protects from liver injury and fibrosis in a mouse model of sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 2010;138(7):2499-508.
76. Plum W, Tschaharganeh DF, Kroy DC, Corsten E, Erschfeld S, Dierssen U, i sur. Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2236-46.
77. Ceasrine AM, Ruiz-Otero N, Lin EE, Lumelsky DN, Boehm ED, Kuruvilla R. Tamoxifen Improves Glucose Tolerance in a Delivery-, Sex-, and Strain-Dependent Manner in Mice. *Endocrinology.* 2019;160(4):782-90.
78. Falke LL, Broekhuizen R, Huitema A, Maarseveen E, Nguyen TQ, Goldschmeding R. Tamoxifen for induction of Cre-recombination may confound fibrosis studies in female mice. *J Cell Commun Signal.* 2017;11(2):205-11.
79. Blum KM, Roby LC, Zbinden JC, Chang YC, Mirhaidari GJM, Reinhardt JW, i sur. Sex and Tamoxifen confound murine experimental studies in cardiovascular tissue engineering. *Sci Rep.* 2021;11(1):8037.

80. Duan JL, Ruan B, Yan XC, Liang L, Song P, Yang ZY, i sur. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice. *Hepatology*. 2018;68(2):677-90.
81. Bersell K, Choudhury S, Mollova M, Polizzotti BD, Ganapathy B, Walsh S, i sur. Moderate and high amounts of tamoxifen in α MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Dis Model Mech*. 2013;6(6):1459-69.

11. Životopis

Dino Šisl rođen je 18.5.1993. u Osijeku. Nakon završene osnovne škole i opće gimnazije u Belom Manastiru, 2011. godine upisuje studij medicine na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Tijekom pete godine studija, putem Erasmus+ programa, boravio je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, gdje je također odradio i stručnu praksu. Diplomirao je 2017. godine te je nakon odrađenog pripravničkog staža za doktore medicine zaposlen na istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost „Uloga Notch signalnog puta u patogenezi jetrene fibroze“, voditelja prof.dr.sc. Tomislava Kelave te je upisao poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo. Istraživački rad provodi na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, u Laboratoriju za molekularnu imunologiju, a na Zavodu za fiziologiju i imunologiju sudjeluje u izvođenju nastave za studente medicine na hrvatskom i engleskom jeziku. Tijekom rada na projektu redovito je izlagao rezultate na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te je prvi autor na dva, a koautor na pet međunarodno indeksiranih radova..