



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Játra a vliv alkoholu na hepatocyty**

**The liver and the effect of alcohol on hepatocytes**

Bakalářská práce

Studijní program : Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Richard Becke

**Tereza Hrubcová**

---

**Kladno, 2017**

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Tereza Hrubcová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Játra a vliv alkoholu na hepatocyty**  
Téma anglicky: The liver and the effect of alcohol on hepatocytes

### Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude problematika onemocnění jater vlivem alkoholu, který v dnešní době je častým tématem.

Obecná část bude zaměřena na anatomii a histologii jater, fyziologii jaterních buněk. V této části bude také zahrnuta část biochemie, a to z hlediska etanolu a jeho metabolismu v těle.

Mezi další témata, o kterých se bude v obecné části hovořit, bude patologie jater vlivem alkoholu, přesněji se bude jednat o cirhózu a steatózu postihující játra a další onemocnění s tím spojené. Menší část bude věnována alkoholismu jako nemoci a statistice tohoto onemocnění v České republice.

Praktická část práce se bude věnovat přípravě preparátů zdravých a postižených jater. Bude použito několik barvicích histologických metod a průkaz glykogenu pomocí PAS reakce. Preparáty budou fotograficky zdokumentovány a popsány.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Renate Lullman- Rauch, Histologie, ed. ed. 3., Praha: Grada, 2011, 556 s., ISBN 978-80-247-3729-4
- [2] Štern Petr, Obecná a klinická biochemie, ed. ed. 2., Karolinum, 2011, 269 s., ISBN 978-80-246-1979-8
- [3] Ehrmann, Jiří a Petr Schneiderka, Alkohol a játra, Praha: Grada, 2006, 184 s., ISBN 80-247-1048-X

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: MUDr. Richard Becke

Konzultant: as. MUDr. Lenka Fialová, CSc.

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Játra a vliv alkoholu na hepatocyty“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 19. května 2017

.....  
podpis

## **Poděkování**

Ráda bych tímto způsobem poděkovala svému vedoucímu práce MUDr. Richardu Beckemu za jeho čas a odborné vedení práce, díky kterému tato práce mohla být zrealizována. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Elišce Boučkové, která byla ochotna se podílet na mé realizaci praktické části a věnovala mi svůj čas a odborné rady z oblasti histologie. V další řadě bych ráda poděkovala paní MUDr. Lence Fialové CSc. za ochotu a vstřícnost při konzultaci biochemické části mé práce. V poslední řadě bych chtěla poděkovat 1.LF UK Ústavu histologie a embryologie za možnost zhotovit histologické preparáty v jejich prostorech.

## **Abstrakt**

Bakalářské práce se věnuje problematice onemocnění jater vlivem alkoholu, který v dnešní době je častým tématem.

Obecná část je zaměřena na anatomii a histologii jater, fyziologii jaterních buněk. V této části je také zahrnuta část biochemie, a to z hlediska ethanolu a jeho metabolismu v těle.

Mezi další témata, o kterých v obecné části hovoříme je patologie jater vlivem alkoholu, přesněji cirhóza a steatóza postihující játra a další onemocnění s tím spojené. Malá část se věnuje alkoholismu jako nemoci a statistice tohoto onemocnění v České republice.

Praktická část práce se věnuje přípravě preparátů zdravých a postižených jater. Zde je zahrnuto několik barvicích histologických metod a průkaz glykogenu pomocí PAS reakce. Preparáty jsou následně fotograficky zdokumentovány a popsány.

## **Klíčová slova**

Játra, ethanol, cirhóza, steatóza, alkoholická hepatitida.

## **Abstract**

The bachelor thesis deals with the problem of liver disease due to alcohol, which is a frequent topic in nowadays.

The general part is focused on liver anatomy and histology, liver cell physiology. This part also includes part of biochemistry, from the ethanol point of view and its metabolism in the body.

Other topics, that we do talk about in general, are liver pathology due to alcohol, more precisely cirrhosis and steatosis affecting the liver and other related diseases. A small part deals with alcoholism as a disease and statistics of this disease in Czech Republic.

The practical part is devoted of preparing slides of healthy and affected liver. Here were included several histological staining methods and demonstration of glycogen by PAS reaction. Slides were later photographically documented and described.

## **Keywords**

Liver, ethanol, cirrhosis, steatosis, alcoholic hepatitis.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Játra.....	10
2.1.1	Tvar a členění jater.....	10
2.1.2	Stavba jater.....	11
2.1.3	Průtok krve játry.....	12
2.1.4	Žlučové cesty a žlučník.....	12
2.2	Histologie jater.....	13
2.2.1	Stroma.....	13
2.2.2	Lalůček centrální vény.....	14
2.2.3	Sinusoidy.....	14
2.2.4	Členění jaterního parenchymu.....	15
2.2.5	Hepatocyty.....	16
2.2.6	Žlučník a vývodné žlučové cesty.....	18
2.3	Fyziologie jaterních buněk.....	19
2.3.1	Hepatocyty.....	20
2.3.2	Vychytávání, zpracování a sekrece látek hepatocyty.....	20
2.3.3	Žluč.....	22
2.3.4	Metabolické funkce jater.....	24
2.3.5	Játra a vitaminy rozpustné v tucích.....	26
2.3.6	Játra jako zásobárna mědi a železa.....	27
2.3.7	Kupfferovy buňky.....	28
2.3.8	Itovy buňky.....	30
2.4	Ethanol, nejběžnější droga v naší kultuře.....	31
2.4.1	Metabolismus ethanolu.....	31
2.5	Patologické změny jater vlivem alkoholu.....	33

2.5.1	Steatóza jater .....	33
2.5.2	Alkoholická hepatitida .....	34
2.5.3	Cirhóza .....	35
2.5.4	Alkohol v České republice .....	36
3	Cíl práce .....	37
4	Metodika .....	38
4.1	Odběr a fixace vzorku .....	38
4.2	Zalévání do parafinu .....	38
4.3	Krájení řezů .....	39
4.4	Deparafinace .....	39
4.5	Barvení .....	40
4.5.1	Barvení hematoxylin-eosin .....	40
4.5.2	PAS reakce – průkaz polysacharidů .....	43
4.5.3	Zelený trichrom .....	44
4.5.4	Barvení Azanem .....	47
4.6	Odvodnění, projasnění a montování .....	49
5	Výsledky .....	50
5.1	Barvicí metoda hematoxylin- eosin .....	50
5.2	Barvicí metoda Azan .....	54
5.3	PAS reakce – průkaz glykogenu .....	57
5.4	Barvicí metoda zelený trichrom .....	60
6	Diskuze .....	63
7	Závěr .....	66
8	Seznam použitých zkratk .....	67
9	Seznam použité literatury .....	68
10	Seznam použitých obrázků .....	70



# 1 ÚVOD

Problematika alkoholismu je častým tématem dnešní doby, v úzké souvislosti s postižením jater. Požívání nadměrného množství alkoholu má za následek změnu morfologie a fyziologie jater, která je pro život člověka velmi důležitá. V České republice se spotřeba alkoholu od roku 1950 zvýšila, průměrně každý pátý dospělý pije zdravotně rizikovým způsobem.

Člověk je dokonalá funkční jednotka, ve které probíhají neuvěřitelné procesy a každý „díl“ je pro tento velký proces důležitý. Každý orgán v našem těle má svou funkci a zároveň vše pracuje jako celek. Největší exokrinní žlázou tohoto celku jsou játra, zodpovědná za metabolické funkce, které v těle probíhají. Bez jejich funkce by tělo nebylo schopné detoxikace, metabolismu důležitých živin, sekrece a exkrece, degradace steroidních hormonů. Játra také ukládají různé látky, mají velký význam pro krevní oběh a mnoho dalších funkcí. Jaterní buňky (hepatocyty), které mají na starost detoxikaci alkoholu neboli metabolismus ethanolu nejsou však všemohoucí. Dlouhodobý přísun velkého množství alkoholu hepatocytům neprospívá. Hepatocyty při každodenním odbourávání ethanolu dlouhodobého alkoholika ztrácejí svou funkci a zanikají.

Mezi nejvýznamnější postižení jater vlivem alkoholu patří cirhóza a steatóza. V případě zákazu příjmu alkoholu je poškození jater steatózou reverzibilní. Tukové kapénky, které se během steatózy vytvářejí, se vstřebají a jaterní parenchym má možnost obnovení. V druhém případě tomu už tak není. Cirhóza je natolik vážná, že obnova jater není možná. Vazivo, které nahradilo veškeré hepatocyty, zůstává a funkce jater je nemožná.

Fyziologické změny jater lze zjistit z biochemického hlediska, kdy sledujeme především jejich funkce porovnáním biochemických hodnot určených k vyšetření jater. Patologické struktury lze pozorovat pomocí vytvořených preparátů tkáně z histologického vyšetření.

Cílem této práce je čtenáře seznámit s morfologickou a fyziologickou stránkou jater. V teoretické části je popsána obecná anatomie a histologie jater, dále je zde zahrnuta funkce jaterních buněk. Důležitým předmětem je také ethanol, který má ve velkém množství negativní vliv na hepatocyty a na celkovou strukturu jaterního parenchymu. Patogenní struktura je hlavním cílem praktické části, kdy jsou z postižených jater vytvořeny preparáty pro seznámení struktury v mikroskopu.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Játra

Játra jsou největší exokrinní žlázou produkující žluč v lidském těle nezbytnou pro život. Za jednu minutu jimi protéká přibližně 1500 ml krve a mají jak oběh funkční (portální), tak oběh nutritivní (a. hepatica). Základní funkční jednotka jater je jaterní lalůček. Nejdůležitější enzymy tohoto lalůčku mají různé lokalizace, určující charakter metabolických pochodů, které v něm probíhají. Oxidativní procesy probíhají především centrálně, na periférii lalůčku najdeme spíše procesy redukčního charakteru [1].

Tento parenchymový orgán se nachází v pravé horní části břišní dutiny v těsné blízkosti bránice a dvanáctníku. Převážně jsou uložena volně.

Jedná se nejen o největší, ale i nejtěžší žlázu lidského těla, průměrná hodnota hmotnosti jater se uvádí 1,5 kg. Mají hnědočernou barvu a pohmatem se jedná o měkkou a poddajnou hmotu, která je relativně křehká [2].

#### 2.1.1 Tvar a členění jater

Svým tvarem nám játra mohou připomínat trojboký jehlan položený na bok, jehož základna je přiložena k pravé břišní stěně a vrcholem směřující k levé břišní stěně [3].

Vyklenutá kraniální plocha jater, která je přizpůsobena klenbě bránice, se nazývá facies diaphragmatica. Na játrech dále popisujeme facies visceralis, spodní plochu s otisky orgánů, o které se opírá [4]. Tunica serosa pokrývá téměř celý povrch jater, jedná se o lesklý peritoneální povlak, který je připojen vrstvičkou vaziva tunica subserosa k hlubší tunica fibrosa [2].

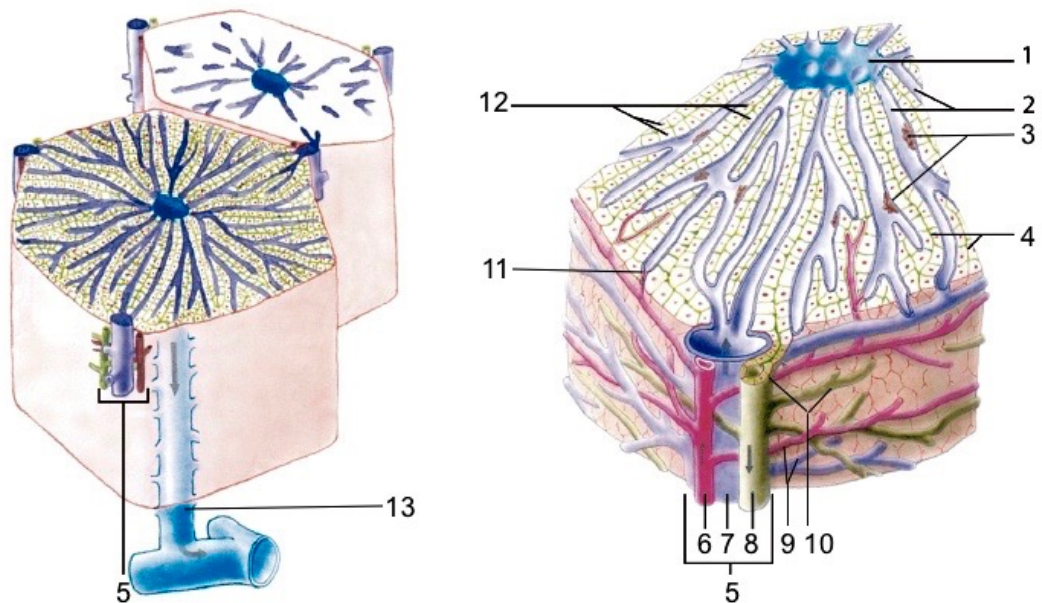
Charakteristické rýhy nesoucí se na spodní ploše jater (facies visceralis) oddělují čtyři jaterní laloky (lobi hepatis). Největší je lalok pravý (lobus dexter), oproti němu menší, plochý lalok levý (lobus sinister). Mezi levým a pravým lalokem se nachází zaobleně čtverhranný lobus quadratus a lobus caudatus, který je ze všech laloků nejmenší, oválný, mírně prominující [2].

Játra jsou poměrně měkký orgán, proto je jejich těsná blízkost s okolními orgány výsledkem jejich tvaru. Na viscerální ploše se nachází hned několik otisků těchto orgánů [2]. Na levém laloku se objevuje rozsáhlý otisk žaludku (impressio

gastrica) před otiskem dolní části jícnu (*impressio oesophagea*). Část pravého laloku, krček žlučníku a *lobus quadratus* leží na duodenu (*impressio duodenalis*). Otisk *flexura coli dextra* (*impressio colica*) na ventrální části pravého laloku s tělem žlučníku a dorsální část pravého laloku, která se klade na pravou ledvinu a nadledvinu (*impressio renalis, suprarenalis*) [4].

### 2.1.2 Stavba jater

Specifická tkáň jater zvaná parenchym je tvořena jaterními buňkami (*hepatocyty*). Svým uspořádáním tvoří *hepatocyty* trámčité epitel. Trámce z *hepatocytů* jsou ploché a navzájem nepravidelně anastomosují. Mezi trámci jaterních buněk se vyskytují v těsné blízkosti cévy. Základní stavební jednotkou jater je tzv. *lalůček centrální žíly*, tvořen trámci spolu s cévami uspořádanými do pěti- až sedmibokých hranolů. Jednotlivé *lalůčky centrální vény* jsou od sebe odděleny malou vrstvou vaziva [2].



Obrázek 1 : *Lalůček centrální žíly*. Upraveno [2].

1 – *v. centralis*, 2 – *jaterní sinusoidy*, 3 – *Kupfferovy buňky*, 4 – *žlučové kapiláry mezi jaterními buňkami a intralobulární žlučovod*, 5 – *trias hepatica*, 6 – *a. interlobularis*, 7 – *v. interlobularis*, 8 – *interlobulární žlučovod*, 9- *cirkumlobulární arterie a žíla*, 10 – *Heringovy kanálky*, 11 – *vnitřní kořeny v. portae*, 12 – *jaterní trámeček*, 13 – *v. sublobularis*.

### 2.1.3 Průtok krve játry

Rozeznáváme jaterní oběh funkční a výživný.

**Funkční oběh** zajišťuje vrátnicová žíla (v. portae) spolu s jejími větvemi. Vrátnice přivádí krev ze všech nepárových orgánů, tedy ze stěn žaludku, sleziny, slinivky břišní a ze střeva. Vrátnicová žíla vstupuje do jater v porta hepatis a dělí se na větve pro pravý a levý lalok. Uvnitř laloků dále probíhají žíly v portobiliárním prostoru, tedy jsou to tzv. interlobulární žíly. Z těchto žil odstupují žíly obkružující lalůček a probíhají až k periferiím lalůček (vv. circumlobulares). Z žil obkružujících lalůček jdou jaterní sinusoidy, procházející mezi trámci hepatocytů. Sinusoidy se sbíhají do centrální žíly (v. centralis), v. centralis se na bázích lalůček spojují ve větší jaterní žíly (v. hepaticae), které opouštějí játra [5].

**Nutritivní oběh** je zabezpečován jaterní tepnou (a. hepatica), která převádí do jater dobře okysličenou krev. Větví se obdobně jako vrátnicová žíla. Větve jaterní tepny (aa. circumlobulares) se na úrovni žil obkružujících lalůčky napojují na sinusoidy, tedy v kapilárách mezi trámci jaterních lalůček teče krev smíšená, tj. žilní a tepenná [5].

### 2.1.4 Žlučové cesty a žlučník

**Cesty žlučové** dělíme na intrahepatální a extrahepatální.

Intrahepatální žlučové cesty začínají mezi buňkami trámců v lalůčkách jaterních v podobě žlučových kapilár, přes Heringovy kanálky a interlobulární žlučovody. Dále postupují jako segmentové a lalokové žlučovody až do porta hepatis. Samostatnou stěnu žlučovodů můžeme pozorovat už od Heringových kanálků. Stěnu větších žlučovodů, do nichž se napojují žlučovody interlobulární, tvoří epitelová výstelka a vazivo s hladkou svalovinou [2].

Extrahepatální žlučové cesty začínají jako pravý (ductus hepaticus dexter) a levý jaterní vývod (ductus hepaticus sinister) v porta hepatis. Jejich spojením vzniká asi 2-4 cm dlouhý, společný jaterní vývod (ductus hepaticus communis). Spojením s ductus cysticus vytváří hlavní žlučovod (ductus choledocus), který podbíhá horní úsek duodena a pokračuje podél jeho vnitřního okraje. V části slinivky břišní je zezadu vtlačen do hlavy slinivky a šikmo prostupuje stěnou duodena. Spolu s ductus pancreaticus ústí na papilla duodeni major [2].

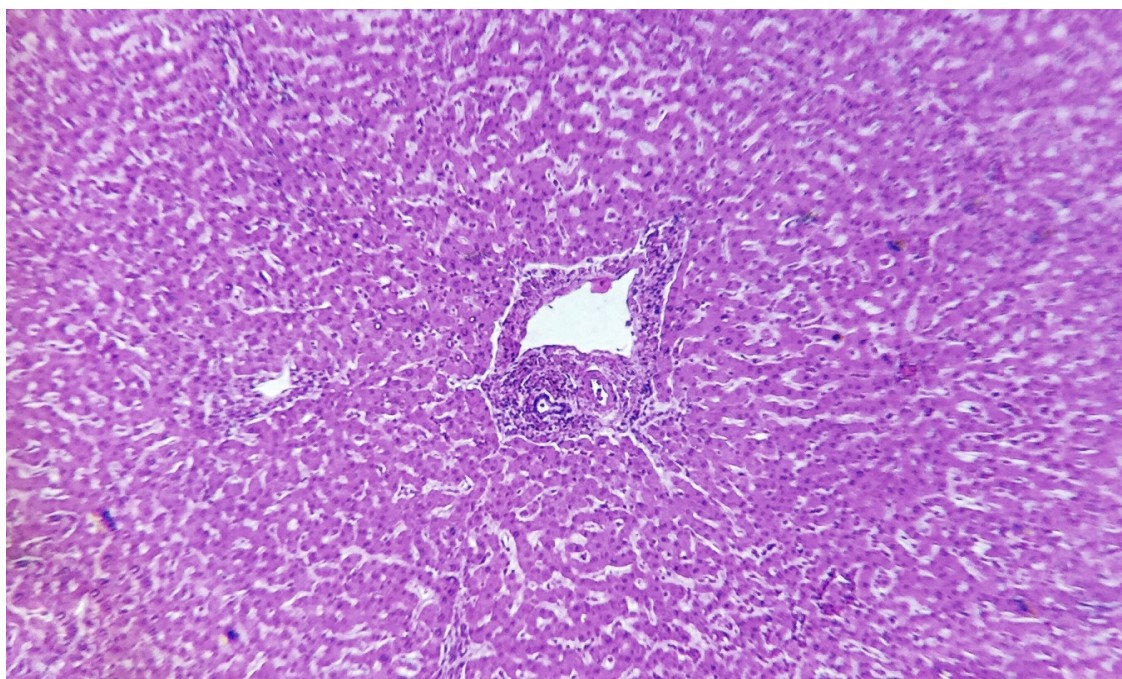
**Žlučník** se nachází na spodní ploše jater, se kterými je spojen vazivem. Jeho tvar je hruškovitý a rozšířená bazální část přesahuje dolní okraj jater [6]. Povrch žlučníku je kryt pobřišnicí. Stavba jeho stěny se prakticky neliší od ostatních žlučových cest. Vnitřní povrch žlučníku tvoří sliznice složená v četné řasy vytvářející síťovitý reliéf. V části počátečního oddílu žlučnickového vývodu a v krčku žlučnickového měchýře se vytvářejí spirální řasy, které spolu se svěračem v krčku měchýře tvoří funkční jednotku - uzávěrový mechanismus, pomocí kterého se reguluje odtok žluče do žlučového [5].

## 2.2 Histologie jater

Morfologickou jednotku jater tvoří jaterní buňky – hepatocyty. Tyto buňky tvoří trámce uspořádané to jaterních lalůčků, které jsou základní stavební jednotkou jater.

### 2.2.1 Stroma

Povrch jater je kryt tenkým vazivovým pouzdem, zvaným capsula Glissoni, ten je zesílen v oblasti hilu, do kterého přichází vena portae, arteria hepatica, a naopak játra v něm opouštějí pravý a levý ductus hepaticus a lymfatické cévy. Všechny tyto cévy a vývody jsou obklopeny vazivem v celém svém průběhu, počínaje jejich začátkem (či zakončením) v portobiliárních prostorech. Tato místa zde mají vyvinutou síť retikulárních vláken podporujících hepatocyty i endotelie jaterních sinusoidů [7].



Obrázek 2 : Mikroskopické znázornění jater : Portobiliární prostor. (Tereza Hrubcová, 2017).

## 2.2.2 Lalůček centrální vény

Hepatocyty svým uspořádáním vytvářejí strukturální jednotky jater, nazývané lalůček centrální vény. Lalůček má podobu nepravidelného hranolu, v jehož podélné ose probíhá vena centralis. U některých živočichů jsou jednotlivé lalůčky od sebe odděleny tenkou vrstvou vaziva, u člověka k tomu ale nedochází. Vazivo se vyskytuje jen v některých oblastech, obsahujících žlučovody a krevní cévy. Tyto prostory jsou obsazeny portálními triádami. Každá se skládá z venuly, arterioly, žlučovodu a doprovodných lymfatických cév. Věna je z nich obvykle největší. Arteriola přivádí krev z truncus coeliacus. Žlučovod s výstelkou kubického epitelu odvádí žluč a ústí do ductus hepaticus. Trámce hepatocytů jsou v jaterním lalůčku uspořádány radiálně a vytvářejí plotny směřující od periferie k centru lobulu a volně spolu anastomozují. Prostor mezi plotnami vyplňují kapiláry – jaterní sinusoidy [7].

## 2.2.3 Sinusoidy

Sinusoidy začínají na periferii lalůček a probíhají směrem k centrální véně. Mají širší lumen než běžné kapiláry, šířka lumenu je přibližně 15  $\mu\text{m}$ . V jejich stěně můžeme najít tři typy buněk: endotelové buňky, Kupfferovy buňky, Itovy buňky [8].

**Endotelové buňky** mají ploché tělo a obsahují velké transcelulární fenestrace (šířka 100 nm) uspořádané do síta. Fenestrace nejsou uzavřeny diafragmou a chybí zde bazální lamina [8]. Mezi hepatocyty a endotelovými buňkami se nachází štěrbina, která je od sebe odděluje, nazývá se Disseho prostor [7]. Povrch hepatocytů obrácený směrem do Disseho prostoru je opatřen mikrokly, které jsou omývány tekutou částí krve a zodpovídají za látkovou výměnu. Endotel nepředstavuje žádnou difúzní bariéru, tedy všechny složky krve mají volný přístup do Disseho prostoru a naopak všechny proteiny a lipoproteiny tvořené v hepatocytech mají přístup do krevního řečiště [8].

*„Stavba stěny sinusoid, která je rozhodující pro efektivní látkovou výměnu, není samozřejmostí: velké fenestrace jsou patrně indukovány hepatocyty a Itoými buňkami, na jejich udržení se podílí aktinový cytoskelet endothelu. Při jaterní cirhose se tato specifická stavba ztrácí („kapilarizace“ sinusoid)“ [8].*

**Kupfferovy buňky**, typické mikrofágy, se nacházejí na luminálním povrchu endotelu. Jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému (MFS) a jejich hlavní funkcí je

odstranění cizích částic, bakterií, přestárých erytrocytů, odbourávání hemoglobinu. Nejaktivnější Kupfferovy buňky se nachází v zóně 1 jaterního acinu, na periférii lalůčku [7].

V Disseho prostoru se také jednotlivě vyskytují hvězdicové elementy, zvané **Itovy buňky**, které obsahují velké tukové kapénky. Mají schopnost střídat exogenní vitamín A v tukových kapénkách, který je vstřebatelný ve střevě [7]. Itovy buňky jsou mimo jiné považovány za producenty nepatrných intralobulárních vazivových fibril. V běžném histologickém preparátu můžeme pomocí impregnace stříbrem ozřejmit tenké snopečky retikulárních vláken, ležících v Disseho prostoru [8].

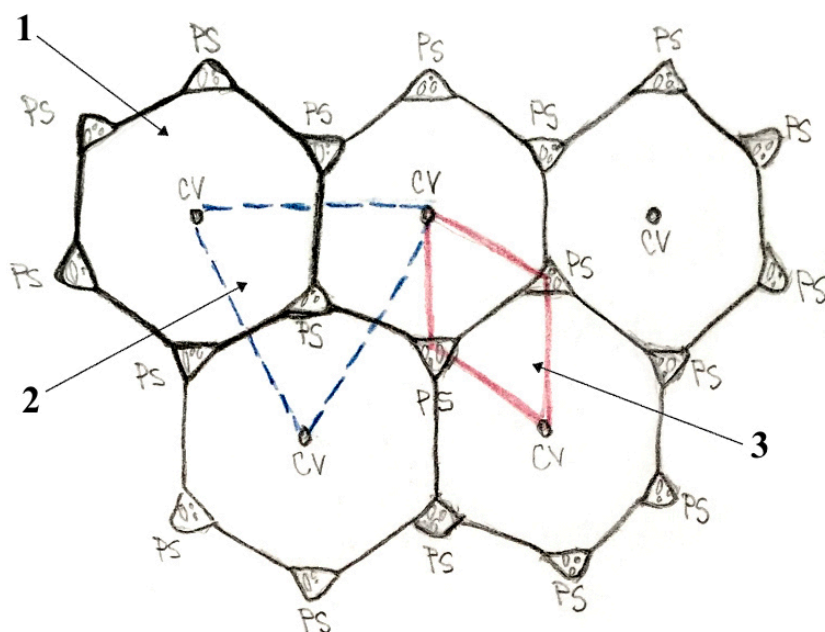
#### 2.2.4 Členění jaterního parenchymu

Byly navrženy tři způsoby členění jaterního parenchymu a každý způsob staví do středu stavební nebo funkční jednotky jiný útvar – lalůček centrální vény, jaterní acinus a portální lalůček.

**Lalůček centrální vény** již dříve popsán, s centrální žilou v jeho středu, která je začátkem odtokových žil. Naopak přírodní interlobulární a cirkumlobulární cévy lalůček obklopují [8].

**Acinus**, jehož středem jsou terminální úseky přírodních cév, obkružující periférii jaterního lalůčku naznačuje tvar kosočtverce. Tyto terminální cévní větve rozvádějí krev na obě strany, tedy do dvou sousedních lalůčků. Acinus zahrnuje všechny hepatocyty, které jsou zásobovány jedním terminálním cévním svazkem. Hepatocyty leží ve třech metabolických zónách. Hepatocyty nejbližší k ose acinu jsou nejlépe zásobovány kyslíkem a živinami, leží v metabolické zóně 1. Hepatocyty nejvzdálenější od osy acinu a zároveň v centru klasického lalůčku tvoří zónu 3 a jsou tedy nejhůře zásobeny. Ve středu mezi tím se nachází zóna 2. (viz obrázek 3).

**Portální lalůček** má ve svém středu portobiliární prostor a útvary, které se v něm nalézají: větve v. portae, a. hepatica propria a žlučovod. Portální lalůček je definován jako trojúhelník, v jehož vrcholech leží centrální vény sousedních lalůčků [8].



Obrázek 3 : Členění jaterního parenchymu. (Tereza Hrubcová, 2017).

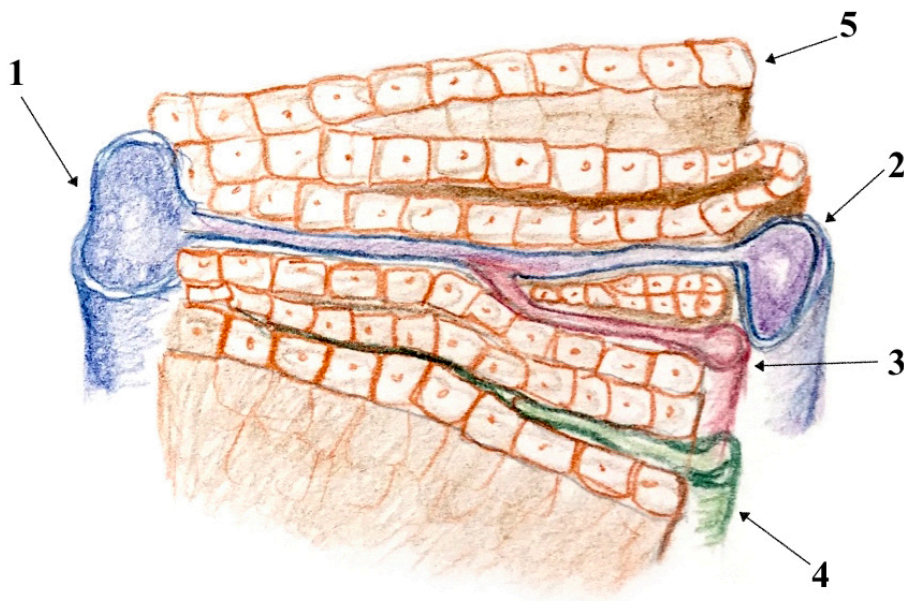
1 – jaterní lalůček, 2 – portální lalůček, 3 – acinus, CV – centrální vena, PS – portobiliární prostor.

## 2.2.5 Hepatocyty

Jaterní buňky představují asi dvě třetiny celkové buněčné populace jaterní tkáně. Mají tvar mnohostěnu a měří přibližně 20-30  $\mu\text{m}$ . V důsledku velkého množství mitochondrií a hladkého endoplazmatického retikula je jejich cytoplazma eosinofilní. Tímto můžeme pozorovat na preparátech barvených metodou hematoxylin-eosin. Hepatocyty mají odlišnou strukturální, histochemickou a biochemickou charakteristiku, v závislosti různých vzdáleností od portálních triád. Každá jaterní buňka je svým povrchem ve styku se stěnou sinusoid prostřednictvím Disseho prostoru a zároveň přiléhá k sousedním hepatocytům. V místě, kde se hepatocyty dotýkají, se vytváří tubulární prostor, zvaný jako žlučový kanálek. Tyto trubicové prostory o průměru 1-2  $\mu\text{m}$  představují počáteční část, od které postupuje vývodný žlučový systém. Jejich ohraničení se skládá pouze z plazmalemy přiléhajících hepatocytů a jejich vnitřní povrch je opatřen malým množstvím mikrokvlků. Buňky v okolí žlučových kanálků jsou prostřednictvím zonulae occludentes pevně stmeleny a propojeny velkým počtem nexů, které jsou důležité pro jejich fyziologickou aktivitu. Kanálky prostupující podél jaterních lalůčků vytvářejí anastomozující síť, končících v portálních prostorech. Žluč teče z centra klasického lalůčku do periferie, tedy v opačném směru než krev [7].



Žluč vstupuje v periférii lalůček do Heringových kanálků a posléze do interlobulárních žlučovodů, které jsou vystlány kubickým epitelem [7]. Pod epitelem nasedajícím na bazální membránu se nachází tenká vrstvička vaziva. Interlobulární žlučovody následují větvení vena portae a splývají v pravý a levý ductus hepaticus se silnější vazivovou stěnou vystlanou jednovrstevným cylindrickým epitelem [9].



Obrázek 4 : Jaterní lalůček. (Tereza Hrubcová, 2017).

1 – Centrální žíla, 2 – interlobulární žíla, 3 – interlobulární arterie, 4 – interlobulární žlučový kanálek, 5 – trámce hepatocytů.

Na povrchu hepatocytů, obrácených do Disseho prostorů, se nacházejí četné mikrokilky, avšak povrch je vždy oddělen od sinusoid. Jaterní buňky obsahují jedno až dvě velmi světlá jádra s jedním nebo dvěma typickými jadérky. Některá jádra jsou nápadná svojí velikostí, a to v důsledku několika násobků haploidního počtu chromosomů. Jsou to jádra polyploidní a jejich velikost je úměrná jejich ploiditě. Hepatocyty obsahují velké množství drsného a hladkého endoplazmatického retikula. Drsné endoplazmatické retikulum vytváří shluky, zvané bazofilní tělíska. V hladkém endoplazmatickém retikulu rozptýleném v cytoplazmě se odehrává řada důležitých dějů. Jsou to oxidační, metylační a konjugační pochody, které jsou potřebné k inaktivaci nebo detoxikaci látek před jejich vyloučením z těla. Hladné retikulum je labilním systémem, který bezprostředně reaguje na změny prostředí [7].

*„Jedním z důležitých dějů, probíhajícím v hladkém endoplazmatickém retikulu, je konjugace hydrofobního toxického bilirubinu na neškodný ve vodě rozpustný bilirubin-glukuronid pomocí enzymu glukuronyltransferázy. Tento konjugát je hepatocyty secernován do žluči. Není-li bilirubin či bilirubin-glukuronid patřičně vylučován, dochází k chorobným stavům, které se vyznačují žloutenkou.“ [7].*

Jaterní buňky jsou místem, kde dochází ke střádání některých metabolitů. Sacharidy jsou v játrech střádány ve formě glykogenu, který můžeme pod elektronovým mikroskopem pozorovat jako hrubá elektrondenšní granula, hromadící se často ve shlucích hladkého endoplazmatického retikula. Lipidy jsou zde ukládány ve formě triglyceridů v tukových kapénkách [10]. V hepatocytech nedochází nejen k metabolickým dějům základních živin, tj. glycidů, lipidů a bílkovin, ale také k přeměně purinů a steroidů. Další významnou schopností hepatocytů je skladování některých vitamínů, fixování železa a ukládání ho ve formě feritinu, produkování plazmatických bílkovin důležitých nejen pro krevní sražení a krvetvornost [11].

Jaterní buňky mají velkou schopnost regenerace. Po chirurgickém vynětí jater nebo při krátkodobém působení hepatotoxických látek se z dělení zbylých hepatocytů vytvoří nový jaterní parenchym v postižené části. Po dlouhodobém působení cytotoxických látek dochází k trvalému poškození jaterního parenchymu a k bujení vaziva v portobiliárních oblastech, zvané cirhóza [11].

### **2.2.6 Žlučník a vývodné žlučové cesty**

**Intrahepatické žlučové cesty** začínající Heringovými kanálky jsou tenké trubičky, které při okraji lalůčku centrální vény navazují na žlučové kapiláry bez vlastní stěny. Heringovy kanálky vystlány jednovrstevným kubickým epitelem vstupují do portobiliárních prostor a spojují se v interlobulární žlučovody. Stěna interlobulárních žlučovodů je složena z vrstvy vaziva s vlákny cirkulárního a longitudinálního průběhu a její výstelka je z jednovrstevného kubického až nízce cylindrického epitelu. Interlobulární vývody následují větve v. portae k porta hepatis, spojují se v silnější kanálky a vytvářejí lobární žlučovody, vystlané vysokým jednovrstevným cylindrickým epitelem [11].

Ve stěně **extrahepatických žlučových vývodů** nalezneme dvě vrstvy – sliznici a fibromuskulární vrstvu. Sliznice je složena v podélné řasy, tedy na průřezu můžeme sledovat hvězdicovitý tvar. Povrch sliznice pokrývá jednovrstevnatý cylindrický epitel.

Slizniční vazivo je poměrně silné a je složeno z řídkého kolagenního vaziva. Fibromuskulární vrstvu tvoří hustá síť kolagenních a elastických vláken. Síť je prostoupena hladkými svalovými buňkami, které jsou zvláště početné v ductus choledochus [11].

Stěna **žlučníku** se skládá ze sliznice, svalové vrstvy a serózy. Sliznice (tunica mucosa) vybíhá v četné, navzájem spojené řasy. Povrch sliznice je kryt jednovrstevnatým cylindrickým epitelem nasedajícím na bazální membránu. Na laterálních plochách buněk se nacházejí spojovací komplexy. Buňky vylučují hlen, složený z neutrálních a kyselých mukopolysacharidů. Buňky kromě sekrece mají funkci resorpční, resorbují vodu a jiné látky ze žluči, které se mohou hromadit v basální části buněk. Lamina propria mucosae, je složena z řídkého kolagenního vaziva s vlákny elastickými. V místech krčku se ve vazivu nacházejí drobné tubulosní mucinosní žlázy. Tunica muscularis je složena ze snopečků hladkých svalových buněk, mezi nimiž se nacházejí sítě elastických vláken. Seróza pokrývá žlučník v oblasti fundu a na dolní straně žlučníku, na ostatních místech se nachází řídké vazivo adventicie [9].

## 2.3 Fyziologie jaterních buněk

Jaterní tkáň obsahuje epitelovou část tvořenou hepatocyty, endotelovou výstelku, tkáňové makrofágy – Kupfferovy buňky a perivaskulární mezenchymové hvězdicové buňky. Další významné buňky jsou usedlé (NK-buňky) i cirkulující buňky (lymfocyty, leukocyty) a trombocyty. Buňky jater můžeme také rozdělovat na parenchymové a neparenchymové [12].

Játra lze nazvat chemickou továrnou organismu, která plní mnoho úzce spojených funkcí. Játra jsou prvním orgánem, který dostává skoro všechny látky vstřebatelné v trávicím ústrojí prostřednictvím portálního oběhu. Zprostředkovávají metabolismus hlavních živin, plní funkce detoxikační, exkreační a sekreční, také odpovídají za tvorbu a degradaci steroidních hormonů, skladují různé látky. Mají také význam pro krevní oběh, krevní tvorbu a mohou ovlivnit vlastnosti krve. A nemělo by se také zapomínat na význam pro termoregulaci [13].

### 2.3.1 Hepatocyty

Bazolaterální membrána hepatocytů obrácena k sinusoidě sousedí s extracelulárním prostorem, kudy protéká krevní plazma (**krevní pól**). Zde jsou vychytávány látky z krve a zpět do krve jsou předávány produkty syntézy a glukóza. Vrcholový pól je převrácen k žlučovým kanálkům, kde je produkována žluč (**žlučový pól**). Plazmatická membrána žlučového pólu se vyznačuje různými transportními mechanismy, díky kterým jsou ve vodě rozpustné součásti žluče dopravovány do žlučových kanálků [8].

#### Buněčné organely

Hepatocyt je bohatě vybaven buněčnými organelami, které plní specifické funkce. Granulární endoplasmatické retikulum a Golgiho komplex zde slouží k syntéze albuminu, koagulačním faktorům a dalších plazmatických bílkovin. Lysozomy, které se nacházejí především v blízkosti žlučového pólu, se podílejí na odbourávání přebytečných nebo opotřebovaných složek buněk z autofagických vakuol, dále na odbourávání poškozených plazmatických bílkovin. V agranulárním endoplasmatickém retikulu probíhá syntéza žlučových kyselin a lipidů. Lipidy jsou v Golgiho komplexu upraveny a uvolňovány do krve [8].

### 2.3.2 Vychytávání, zpracování a sekrece látek hepatocyty

Játra se vyznačují vysokou metabolickou aktivitou, 28% celkového průtoku krve připadá na tento orgán. Játra metabolizují velké množství látek, endogenního (např. bilirubin, hormony, žlučové kyseliny) a exogenního původu (léky, xenobiotika, toxiny) přicházejících cestou v. portae a systémovou cirkulací. Hepatocyty tyto látky zpracovávají v následujících čtyřech krocích:

- Transport látek z krve přes sinusoidální membránu hepatocytů
- Transport látek v intracelulární tekutině hepatocytů
- Intracelulární biotransformace či degradace látek
- Exkrece látek nebo jejich produktů do žluče

Stejně jako jiné epitelové buňky jsou hepatocyty vybaveny transportními mechanismy. Sodíko-draslíková pumpa patřící mezi hlavní transportní mechanismy na bazolaterální membráně je zodpovědná za udržení nízké intracelulární koncentrace sodíku a vysoké koncentrace draslíku. Sodíkový gradient je důležitý pro další transportéry, jako jsou  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport,  $\text{Na}/\text{HCO}_3$  kontrastport, symport sodíku a aminokyselin a také pro jeden z transportérů pro žlučové kyseliny. Pro tyto transportéry funguje jako hnací síla.

Hepatocyty vychytávají glukózu pomocí mechanismu facilitované difúze s transportérem GLUT2 (glucose transporter 2), tento transport není závislý na inzulinu k usnadnění difúze. Pomocí proteinového transportéru NTCP (Na-taurocholate cotransporting polypeptide) jsou vychytávány žlučové kyseliny, ale také steroidy, cyklické oligopeptidy a řady léků. Organické anionty (např. organická barviva, konjugáty steroidů, hormony štítné žlázy, anionické oligopeptidy, prostanoidy, řada léků, toxinů a další xenobiotika) jsou do hepatocytů přenášeny skupinou polyspecifických membránových přenašečů OATP (organic anion transporting polypeptides), který rovněž transportují žlučové kyseliny mechanismem nezávislým na sodíku. K přenosu organických kationtů (např. aromatické a alifatické aminy a některé léky) přes bazolaterální membránu hepatocytů slouží přenašeče OCT1 a OCT2 (organic cation transporter) [3].

Uvnitř hepatocytů probíhá transport od bazolaterální k apikální membráně, u některých látek je transport zprostředkován vazbou na specifické intracelulární vazebné proteiny. Příkladem jsou žlučové kyseliny, které mají u člověka tři přenašečové proteiny: di-hydrodioldehydrogenáza, glutathion-S-transferáza B a mastné kyseliny vázající protein. Jestliže je koncentrace žlučových kyselin v sinusoidální krvi vysoká, je pomocí vezikul jejich část intracelulárně transportována. Bilirubin po vstupu do hepatocytu je transportován do endoplazmatického retikula, kde je konjugován s kyselinou glukuronovou [3].

### **Biotransformační funkce jater**

Další významnou funkcí jater je biotransformace toxických látek endogenního i exogenního původu. Játra přeměňují:

1. Látky, které vznikly v těle, ale již *nejsou potřebné* (např. steroidní hormony)
2. Látky, které v těle vznikly, ale jsou tělu *jedovaté*. (např. amoniak, bilirubin)
3. Látky, které jsou tělu *cizí* (např. léky, jedy)

Játra jsou vybavena množstvím enzymů, které umožňují nejrůznější chemické reakce pro tuto funkci. Mezi tyto reakce patří: metylace, hydratace, hydrolyza, deaminace, redukce, oxidace a spousta dalších, na něž často navazuje konjugace. Při konjugaci se na látky naváže některý ze substrátů (glycin, sulfáty, taurin, kyselina octová nebo glukuronová), díky kterému je látka snadno vylučitelná z těla. Například bilirubin, který vzniká při rozpadu hemoglobinu, není rozpustný ve vodě, tedy nemůže být vyloučen z těla močí. V játrech se bilirubin konjuguje s kyselinou glukuronovou za vzniku

bilirubinglukuronátu, který je dobře rozpustný ve vodě a může se snadno vyloučit do žluči a s ní do trávicího systému [13].

### 2.3.3 Žluč

Žluč je nezbytná pro trávení a absorpci tuků, pomocí ní jsou z organismu vylučovány různé endogenní a exogenní látky. Tvorbu a sekreci žluči můžeme rozdělit do několika stadií:

- Žluč je tvořena hepatocyty a její úprava probíhá ve žlučových vývodech
- Skladování a zahušťování žluči probíhající ve žlučníku
- Uvolnění žluči ze žlučníku a transport do duodena

Žluč je složena z anorganických a organických látek, kromě vody, elektrolytů a soli žlučových kyselin obsahuje také cholesterol, lecitin, bilirubin, steroidní hormony, vitaminy, léky, těžké kovy aj. Denně játra produkují přibližně 0,7–1,2 l žluči, která společně s pankreatickou šťávou přispívá k vyrovnání osmotického tlaku a pH v duodenu. Do duodena není uvolňována veškerá žluč, přibližně polovina je skladována a zahušťována ve žlučníku [14].

#### Tvorba žluči

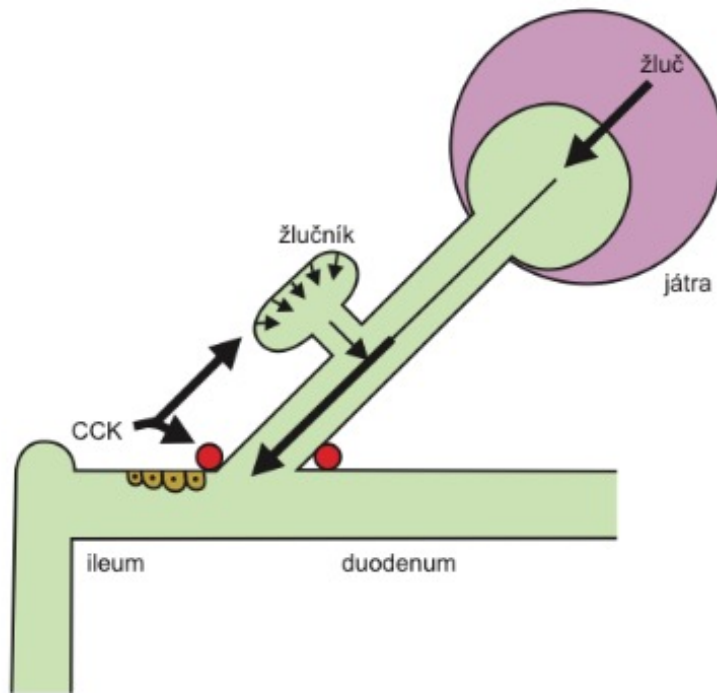
Z cholesterolu se v jaterních buňkách vytvářejí **primární žlučové kyseliny**, které jsou zde konjugovány s glycinem a taurinem, a jejich soli jsou vylučovány do žluči. Z primárních žlučových kyselin (kyselina cholová a chenodeoxycholová) vznikají ve střevě bakteriální činností **sekundární žlučové kyseliny** (kyselina deoxycholová a lithocholová). Přibližně 95 % žlučových kyselin je ve střevě resorbováno do krve. Kyseliny jsou krví transportovány zpět do jater, kde jsou znovu vyloučeny do žluči. Tato cirkulace žlučových kyselin mezi játry a střevem se nazývá enterohepatální oběh. Jen malá část žlučových kyselin opouští tělo stolicí, tedy nevstřebává se ve střevě. Část, která opouští tělo, je nahrazena novotvorbou žlučových kyselin v játrech (denně přibližně 0,5 g) [15].

#### Sekrece žluči

Sekreci žluči stimulují látky zvané choleretika. Mezi nejvýznamnější patří sekretin, který zvyšuje sekreci bikarbonátu do žluči – pufr, který neutralizuje kyselost částečně natrávené potravy ze žaludku [15].

Oddího svěrač je na lačno kontrahován a žluč teče do žlučníku, zde je skladována a zahušťována. Po příjmu potravin se hladká svalovina ve stěně žlučníku začne rytmicky

stahovat. Díky stahům vznikne tlak ve žlučníku a žluč začne odtékat do ductus choledochus. Zároveň přechází Oddiho svěrač do relaxace a žluč odtéká ze žlučového vývodu do duodena. Kontrakce žlučníku stimuluje parasymptikus a humorální účinek cholecystokininu (CCK). Zejména přítomnost mastných kyselin a aminokyselin v duodenu stimuluje sekreci CCK. Látky, které zodpovídají za stimulaci vyprazdňování žlučníku, se nazývají cholagoga [15].



Obrázek 5 : Sekrece a transport žluči v období jídla: CCK kontrahuje žlučník a relaxuje Oddiho svěrač [14].

### Funkce žluči

Žlučové kyseliny jsou amfipatické, mají tedy hydrofobní, ve vodě nerozpustnou část, kterou tvoří steranové jádro, a naopak hydrofilní část, ve vodě rozpustnou, tvořenou karboxylovými a hydroxylovými skupinami. Přítomnost solí žlučových kyselin je nezbytná pro průběh trávení tuků. Díky své amfipatické struktuře mají schopnost emulgovat tuky. Při emulgaci probíhající v tenkém střevě se lipofilní část zanoří do tuku a hydrofilní část zůstává na povrchu. Tím vzniká menší povrchové napětí tuku a dochází k rozpadu tukových kapének na menší kapénky. Smyslem této emulgace je zvětšení plochy, na kterou později působí lipolytické enzymy [15].

Produkty z trávení tuků a vitaminy rozpustné v tucích jsou ve střevě zabudovány do útvarů zvaných micely. Pomocí micel jsou vitaminy a natrávené tuky transportovány ke kartáčovému lemu enterocytů, kde jsou tyto látky uvolněny a enterocyty resorbovány [15].

### 2.3.4 Metabolické funkce jater

Podle přísunu arterií, tedy kyslíkem nasycené krve, můžeme v jaterním lalůčku vymezit tři zóny:

- Vnitřní zóna s velkým přísunem kyslíku – v této zóně především převládají oxidativní procesy (glukoneogeneze, proteosyntéza atd.)
- Střední zóna – zde probíhají oxidativní i redukční procesy
- Vnější zóna s nízkým přísunem kyslíku – v této zóně probíhají nejčastěji redukční procesy (detoxikace).

Hlavním úkolem jater v oblasti metabolismu sacharidů je udržování hladiny glykémie. Játra mají schopnost tvořit glykogen v anabolické fázi metabolismu a opět uvolňovat glukózu ve fázi katabolické. Po vyčerpání glykogenu přicházejí procesy glukoneogeneze.

Oxidace mastných kyselin je hlavním zdrojem energie pro činnost jater. V játrech dále probíhá syntéza cholesterolu a jeho konverze do žlučových kyselin, tvorba lipoproteinů, syntéza fosfolipidů a přeměna glukózy a aminokyselin na mastné kyseliny.

Játra tvoří většinu plazmatických bílkovin a probíhá zde deaminace aminokyselin s jejich případnou konverzí na sacharidy nebo lipidy. Deaminace je začátkem cyklu tvorby močoviny, do kterého vstupuje i amoniak, vzniklý činností střevních mikroorganismů [14].

#### **Metabolismus sacharidů**

Nadbytečná glukóza je v játrech uložena ve formě glykogenu (stejně jako ve svalech). Glukóza se uvolňuje do krve v případě, kdy dochází k hypoglykémii a následně glykogenolýze [15]. Během krátkodobého hladovění játra uvolňují část glukózy k zajištění činnosti neuronů centrálního nervového systému. Při dlouhodobém hladovění dochází k nedostatku glykogenu v játrech, mozek se však na tuto situaci po 24 hodinách adaptuje. Naopak v případě nadbytku glukózy v krvi dochází v játrech k vyššímu vychytávání glukózy a zároveň je stimulována syntéza a uskladnění glykogenu, vyšší aktivitu vykazuje také glykolýza a lipogeneze [3]. Tímto způsobem játra udržují hodnotu glykémie. Tvorbu glykogenu stimuluje inzulín, glykogenolýzu mají na starost katecholaminy a glukagon.



Játra mají také schopnost vytvářet cukry *de novo* z necukerných sloučenin procesem glukoneogeneze. V játrech dochází k novotvorbě cukrů z některých aminokyselin a glycerolu při nedostatku glukózy. Mobilizaci bílkovin a jejich následnou přeměnu na cukry stimulují glukokortikoidy. Dlouhodobě zvýšená koncentrace glukokortikoidu může vést k hyperglykémii a případně ke vzniku diabetu mellitu. V játrech dochází ke konverzi monosacharidů galaktózy a fruktózy na glukózu [15].

Glukóza je tvořena v mitochondriích a částečně v cytoplasmě hepatocytu, a to především z aminokyselin a laktátu, následně je transportována facilitovou difúzí. Do krve se glukóza dostává přes bazolaterální membránu hepatocytu rovněž pomocí facilitové difúze [3].

### **Metabolismus lipidů**

V jaterních buňkách probíhá  $\beta$ -oxidace mastných kyselin za vzniku acetyl-koenzymu A (acetyl-KoA). Ten vstupuje do citrátového cyklu, kde vzniká chemická energie ve formě ATP. Kondenzací dvou molekul acetyl-KoA vzniká acetoacetyl-KoA, ten se v játrech přeměňuje na volný acetoacetát, který je transformován na kyseliny  $\beta$ -hydroxymáselnou a aceton. Výše zmíněné sloučeniny – ketolátky (acetoacetát, kyseliny  $\beta$ -hydroxymáselná a aceton) mohou být ve tkáních oxidovány a sloužit jako zdroj energie při hypoglykémii.

Není-li glukóza energeticky využita nebo uložena v zásobní formě, je v játrech transformována na triacylglycerol, který je zde skladován a slouží jako zásobní zdroj energie. Při stravě bohaté na bílkoviny jsou nadbytečné aminokyseliny ukládány ve formě neutrálních tuků [15].

Játra také plní důležitou funkci tvorbou fosfolipidů, které jsou součástí plazmatických lipoproteinů, účastní se hemostatických procesů a jsou důležité pro tvorbu myelinových pochev a buněčných membrán.

Cholesterol je výchozí látka pro vznik steroidních hormonů, žlučových kyselin a je součástí buněčných membrán. V mikrozomech a cytosolu hepatocytů dochází k tvorbě cholesterolu z acetyl-KoA (endogenní cholesterol), rychlost jeho vzniku je nepřímo úměrná příjmu cholesterolu z potravy (exogenní cholesterol). Z hepatocytů přechází část cholesterolu do krve, kde se stává součástí plazmatických lipoproteinů a část je vylučována do žluči [15].

## **Metabolismus proteinů**

V játrech probíhá deaminace aminokyselin za produkce amoniaku. Deaminace aminokyselin je nezbytná, mají-li být energeticky využity nebo konvertovány na cukry a tuky. Jaterní acinus je vybaven dvěma systémy, určenými pro detoxikaci amoniaku. První z nich je ureosyntetický cyklus, v němž je amoniak detoxikován za vzniku močoviny, druhou možnou cestou je syntéza glutaminu. Zatímco tvorbu močoviny mají na starost především periportální hepatocyty, syntéza glutaminu probíhá v perivenózní oblasti [3].

V játrech se nachází amoniak různého původu. Nevzniká pouze při deaminaci aminokyselin, ale také činností střevních bakterií. Močovina, která je z těla odstraňována ledvinami, vzniká v hepatocytech z CO<sub>2</sub> a dvou molekul amoniaku. Amoniak má toxický účinek na nervové buňky, jeho zvýšená koncentrace v tělesných tekutinách vede k poškození mozku, které se označuje jako jaterní encefalopatie [15].

V hepatocytech jsou syntetizovány všechny plazmatické proteiny s výjimkou imunoglobulinů a von Willebrandova faktoru produkovaného endoteliálními buňkami. Denní produkce plazmatických proteinů se pohybuje od 20 do 50 g. Některé plazmatické proteiny mohou syntetizovat i neparenchymové buňky. Příkladem je retinol vázající protein a alfa-1-antitrypsin, tvořící se v Kupfferových a hvězdicových buňkách [3].

### **2.3.5 Játra a vitaminy rozpustné v tucích**

Játra mají zásadní úlohu v metabolismu lipidů. Jistě nás tedy nepřekvapí, že se výrazně podílejí i na osudu lipofilních vitaminů v organismu.

**Vitamin A** – retinol a jeho deriváty se vstřebává ze střeva a poté je transportován jako součást chylomikronů, popř. VLDL (very low-density lipoprotein). Po vstupu do hepatocytů nastává hydrolýza retinol esterů na volný retinol, ten se poté váže na specifický protein RBS (retinol-binding protein) a částečně na prealbumin. Transportními proteiny je pak retinol vyloučen do sinusoidů. Velká část vázaného retinolu je vychytávána hvězdicovými buňkami, kde se za fyziologických podmínek nachází přibližně 80% vitamínu A v játrech. Retinol může být v játrech oxidován na retinal, který je dále konvertovaný na kyselinu retinovou. Ta je v játrech konjugována s kyselinou glukuronovou a vyloučena do žluči. Následně se enterohepatálním oběhem vrací do jater, případně je z organismu vyloučena [3].

**Vitamin D** je původu rostlinného (D<sub>2</sub>) a živočišného (D<sub>3</sub>), část vitamínu D<sub>3</sub> se tvoří v kůži vlivem ultrafialového záření. Ať je vitamin D jakéhokoliv původu, je zapotřebí jej nejprve aktivovat. Aktivace probíhá ve dvou krocích. V játrech se vitamin D mění na 25-hydroxycholecalciferol, který je transportován do ledvin, kde dochází za účinku parathormonu k další hydroxylaci. Výsledkem aktivace je 1,25-dihydroxycholecalciferol vykazující plnou biologickou aktivitu, především významně zvyšuje vstřebávání vápníku ze střeva [3].

**Vitamin E** se ze střeva vstřebává ve dvou formách – jako alfa-tokoferol a gama-tokoferol. Jejich transport krví probíhá v chylomikronech a VLDL. Hlavní úloha jater je tyto dvě formy oddělit od sebe. Alfa-tokoferol je vyloučen zpět do krve, zatímco gama-tokoferol je dále metabolizován a vyloučen žlučí. Za rozdělení obou forem tokoferolů je zodpovědný specifický tokoferol vázající protein, nacházející se v játrech.

**Vitamin K** je z velké části produkován střevními bakteriemi. Tento vitamin slouží jako kofaktor enzymu gama-glutamyl-karboxylázy, který je zodpovědný za posttranslační karboxylaci zbytků kyseliny glutamové na zbytky gama-karboxyglutamové kyseliny. Tato karboxylace je nezbytnou podmínkou pro aktivaci koagulačních faktorů II, VII, IX a X a také pro antikoagulační faktory – protein C a S [3].

### 2.3.6 Játra jako zásobárna mědi a železa

**Měď** je řazena mezi stopové prvky a je nezbytnou součástí řady enzymů, např. cytochrom c-oxidázy nebo superoxid-dismutázy. Přibližně polovina mědi, která se nachází v potravě, je vstřebávána v jejunu a následně se portální krví ve vazbě na albumin dostává do jater. Ve žluči je vyloučeno více než 80% vstřebané mědi. Přes bazolaterální membránu hepatocytu prostupuje pomocí Ctrl 1 (Chymotrypsin-like protease Protein), v cytosolu se pak váže na transportní protein Atox 1. Během transportu se měď naváže na plazmatický transportní protein ceruloplazmin. Na ceruloplazmin tvořený v játrech se váže 95% mědi přítomné v systémové cirkulaci. Vazba na protein brání zpětnému vstřebávání mědi v tenkém střevě, měď ve formě komplexu je vyloučena do žluči a následně z organismu [3].

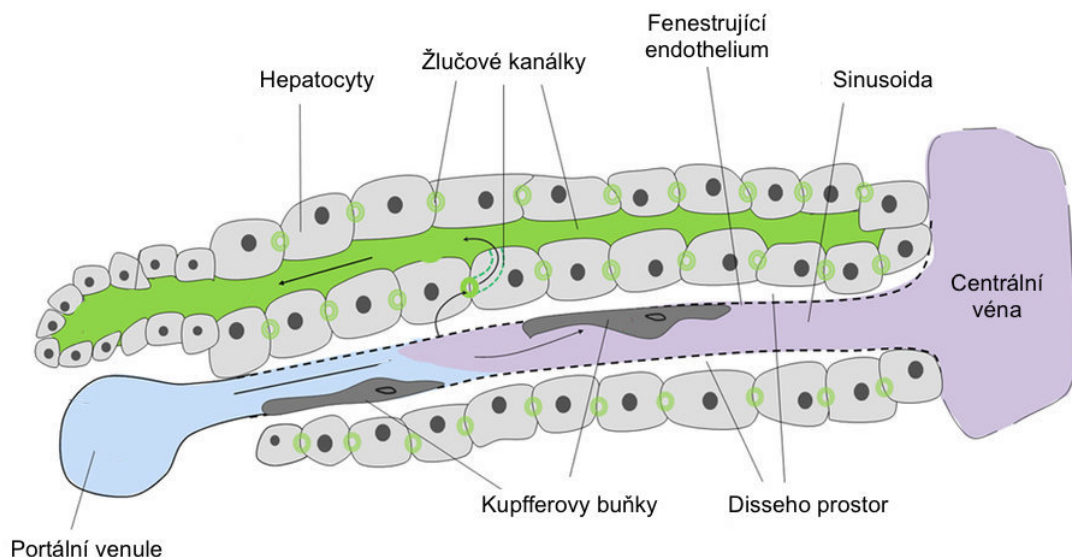
**Železo** se v proximální části tenkého střeva vstřebává a v plazmě se váže na specifický protein jaterního původu – transferin. Pro zajištění enzymatických reakcí zodpovědných za transport elektronů je v buňkách část železa ve volné formě. Většina intracelulárního železa se váže na feritin, z důvodu toho, že železo je pro buňky toxické.

Játra mají také podíl na regulaci některých funkcí v organismu. Je zde vytvářen angiotenzinogen, prekurzor angiotenzinogenu II, který stimuluje sekreci aldosteronu a vykazuje vasokonstrikční účinky, podílí se tak na regulaci objemu extracelulární tekutiny a krevního tlaku.

Hepatocyty produkují během celého života také hormon erythropoetin, protein s pleiotropním růstovým účinkem, především však stimuluje tvorbu erytrocytů v kostní dřeni. U dospělého člověka se většina erythropoetinu tvoří v ledvinách (85%), zbylých 15% je produkováno játry. Játra jsou primárním místem tvorby erythropoetinu ve fetálním období [3].

### 2.3.7 Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky lokalizovány především v periportální oblasti jaterního acinu patří mezi tkáňové makrofágy a jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému. Portální krví jsou do jater přiváděny látky s potenciálně škodlivým účinkem. Kupfferovy buňky tyto látky fagocytují a brání tak jejich přenosu do systémové cirkulace. Dále fagocytují imunokomplexy, staré erytrocyty či zbytky rozpadlých buněk. Aktivace těchto makrofágů je vyvolána různými faktory. Mezi ně patří endotoxin, sepsa, šok, arachidonová kyselina, některé cytokiny a další [3].



Obrázek 6 : Znázornění Kupfferových buněk. Upraveno. [16]

## Imunitní funkce jater

Po dlouhá léta byla úloha jater v obranných reakcích organismu imunology opomíjena, dnes ale existuje řada důkazů svědčících, že játra jsou místem komplexní imunitní aktivity a že hrají klíčovou úlohu při rozvoji některých patologických stavů, mezi které patří například septikemie, metastázy nebo hepatotropní infekce.

Portální krví jsou přiváděny nejrůznější produkty, játra jsou vystavena ohromné antigenní zátěži neškodnými produkty, které musí být obrannými mechanismy tolerovány a zároveň patogeny, které naopak vyžadují rychlou imunitní odpověď. Játra mají velkou zodpovědnost, jejich imunitní systém musí poskytovat ochranu vůči patogenům a metastatickým buňkám a zároveň tolerovat neškodné vlastní a cizorodé antigeny [3].

Přibližně 10% z celkové buněčné populace jater představují buňky imunitního systému, patří mezi ně Kupfferovy a dendritické buňky, dále imunitní buňky, které do jater vstupují a zase odcházejí – lymfocyty a granulocyty. Nemalý podíl na imunitních reakcích mají také endotelové buňky jaterních sinusoid, sloužící jako biofiltr mezi krví v jaterních sinusoidech a tekutinou v Disseho prostorech. Navíc tyto buňky slouží jako účinné antigen prezentující buňky, čímž jsou zapojeny do regulace specifické T-buněčné imunity. Prezentují molekuly HLA I. a II. třídy, mají schopnost pohltit antigeny a po zpracování je předkládají T-lymfocytům.

Kupfferovy buňky mají klíčovou úlohu v přirozené imunitě. Jsou aktivovány různými bakteriálními stimuly, mezi které patří například endotoxin (LPS) nebo bakteriální super antigeny [3]. Endotoxiny jsou součástí stěny gramnegativních bakterií. Nacházejí-li se v krevním oběhu, indukují produkci TNF- $\alpha$  a IL-1 prozánětlivých cytokinů. Za normálních okolností proniká LPS střevní bariérou pouze ve stopových množstvích a je obratem vycytáván a inaktivován Kupfferovými buňkami v jaterních sinusoidech [12].

Kupfferovy buňky produkují další cytokiny, které mohou imunitní reakci podpořit. Patří mezi ně IL-12 a IL-18, které se podílejí na řízení diferenciaci NK buněk a podporují místní expanzi subpopulace cytotoxických NK, které produkují interferon IFN- $\gamma$  s antivirovým účinkem IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ . A leukotrieny jsou rovněž původu z Kupfferových buněk a podporují infiltraci a antimikrobiální aktivitu neutrofilních granulocytů [3].

### **2.3.8 Itovy buňky**

Itovy buňky pojmenované podle japonského anatoma Ito Toshio se nacházejí vedle hepatocytů při vnějších okrajích trámců. Itovy buňky nazývané také jako perisinusoidové buňky jsou méněčetné, nepravidelného tvaru, vklíněné do trámečků zvenčí mezi hepatocyty. Vedle četných lipidových kapének obsahují také filamenta aktinu, myosinu a desminu.

Plní mnoho důležitých funkcí, na starost mají například sekreci složek vazivové matrix mezi trámci (včetně kolagenu) a různých proteoglykanů. Pro Itovy buňky je typické ukládání vitamínu A ve svých tukových kapénkách. Produkují důležitou složku pro regeneraci poškozených jater i jejich normální udržování zvanou růstový faktor. Při regeneraci po toxickém poškození organizují správné postavení trámců. Hrají roli také při patologických procesech tehdy, kdy jsou zanikající hepatocyty nahrazovány kolagenním vazivem, například při jaterní cirhóze [2].

#### **Historie Kupfferových a Ito buněk**

Německý anatom a embryolog Karl Wilhelm von Kupffer, podle kterého jsou dnešní Kupfferovy buňky pojmenovány, objevil roku 1876 tzv. hvězdicové buňky. V té době nebyly známy žádné další typy buněk v okolí endoteliálních buněk jaterních sinusoid. Kupffer se tedy domníval, že se jedná o specializované endoteliální buňky jaterních sinusoid, fagocytující cizorodé látky. Hvězdicové buňky, které Kupffer objevil a popsal, nebyly ve skutečnosti specializované endoteliální buňky sinusoid. Byly to buňky ukládající vitamin A, dnes označované jako Itovy buňky. Skutečné Kupfferovy buňky byly objeveny v roce 1898. Objevil je polský patolog Tadeusz Browicz a v roce 1928 švýcarský anatom K.W. Zimmermann. Na základě elektronového snímku v roce 1970 ukázal Eddie Wisse jednoznačné rozlišení endoteliálních buněk jaterních sinusoid a Kupfferových buněk. Rok poté ukázal K.Wake, že původní Kupfferovy hvězdicové buňky a Itovy buňky jsou identické [17].

## 2.4 Ethanol, nejběžnější droga v naší kultuře

Alkoholické nápoje doprovázejí lidstvo již několik let, pravděpodobně déle než jsou historické záznamy. V naší společnosti je alkohol tolerovanou drogou. Dokáže lidem poskytnout určité uvolnění, chvilkovou úlevu od každodenních starostí, ale naopak některé své uživatele dokáže zotročit v závislost. Nadměrná konzumace alkoholu je vážný společenský problém, který byla snaha zakázat, ale v naší civilizaci bez úspěchu. [18]

Ethanol je látka rozpustná ve vodě i v tucích, v těle se rychle distribuuje a hematoencefalickou bariérou proniká i do mozku. Působí na všechny receptory v synapsích v CNS, ale na žádný z nich se neváže, podobně jako řada jiných těkavých látek s narkotickým a anestetickým účinkem (např. diethylether, chloroform, oxid dusný). Nízká koncentrace v mozku způsobuje euforii, ale zároveň zpomaluje reakce na vnější podněty. Naopak vyšší koncentrace pak působí tlumivě, anesteticky až narkoticky.

Ethanol dokáže otevřít chloridové iontové kanálky řízené GABA-receptory a tím způsobuje hyperpolarizaci neuronů. Významná vazba na GABA receptory nebyla prokázána. Hyperpolarizovaný neuron nemůže plně fungovat, tedy se stává méně citlivým ke vzruchům. Za změny způsobené ethanolem je pravděpodobně odpovědné působení na GABA-receptory [18].

### 2.4.1 Metabolismus ethanolu

90-98% alkoholu je z těla odstraněno enzymovými systémy, zbylé množství se vyloučí dechem, potem a močí. Jsou známy čtyři metabolické cesty ethanolu v lidském těle, jako první a hlavní je alkoholdehydrogenáza (ADH), další cestou je mikrosomální etanolový oxidační systém (MEOS), kataláza nebo neoxidativní metabolismus. Rychlost eliminace ethanolu z organismu je 0,08-0,25 %/hod, rychlost může být zvýšená při indukci MEOS až k hodnotám 0,2-0,25 %/hod.

Hlavní role v metabolismu ethanolu patří cytosolovému dimerickému enzymu **alkoholdehydrogenáze**, metaloenzymu jehož kofaktor je zinek. Katalyzuje přeměnu ethanolu na acetaldehyd a kromě oxidace alkoholů se podílí i na metabolismu steroidů a omega oxidaci mastných kyselin [19].

*„Oxidace etanolu v trávicím traktu může snížit až o 20 % systémovou koncentraci etanolu. ADH je vývojově a sexuálně regulována, jehož důsledkem je nižší aktivita ADH u žen. Tento enzym není také inducibilní a jeho rychlost je limitována nejen dostatkem*

*NAD<sup>+</sup>, ale také jeho nasycením, kdy rychlost přeměny se již nezvyšuje při koncentraci 1% a vyšších“ [19].*

Kromě jater a žaludku je aktivita ADH popisována v celé řadě tkání. Najdeme ji v ledvinách, ovariích, děloze, varlately, nadvarlately, nadledvinkách, sítnici i rohovce.

Na řadu přichází aldehyddehydrogenáza (AIDH) metabolizující vznikající acetaldehyd na konečný produkt – acetát, který se může zapojit do řady metabolických dějů organismu (syntéza cholesterolu, mastných kyselin a jejich esterů). Výskyt AIDH je skoro ve všech orgánech, s vysokou aktivitou v játrech a tkáních, které jsou v přímém kontaktu se zevním prostředím. Mezi tyto tkáně řadíme – plíce a gastrointestinální trakt, zde se uplatňují při oxidaci endogenních, ale i exogenních aldehydů.

Při oxidaci alkoholu na acetaldehyd a následně na acetát jsou zapotřebí redukované nikotinové kofaktory, které mění poměr redukovaného a oxidovaného NAD a tím mění redoxní prostředí buněk. Následkem těchto změn je zvýšená tvorba laktátu a ketolátek, snižování glukoneogeneze a aktivity Krebsova cyklu s následným využíváním acetátu pro syntézu lipidů [19].

**Acetaldehyd** je velmi reaktivní sloučenina. Má schopnost se vázat na nukleové kyseliny, fosfolipidy a především na proteiny včetně albuminu, kolagenu a hemoglobinu. Tímto mění jejich strukturu a funkci.

V roce 1968 byl popsán mikrosomální ethanolový oxidační systém (MEOS) jako jeden z izoenzymů cytochromu P450 označovaný jako cytochrom P450IIE1 nebo CYP2E1. Jeho role spočívá v metabolismu xenobiotik, zejména ethanolu, benzenu, fenolu, acetaminofenu, tetrachlórmetanu a mnoha dalších látek včetně vitamínu D. Tento izoenzym se nachází v endoplazmatickém retikulu jater, plic, placenty, mozku, ale také kůže. CYP2E1 není indukovaný pouze alkoholem, ale i dalšími látkami, které oxiduje. Mezi tyto látky patří např. ketony, alkoholy, benzen a jiné. Další indukce je přítomna i v Kupfferových buňkách, podílejících se na fibrogenězi jaterní tkáně. [19]

*„Chronický etylismus aktivuje tkáňové dýchání a vyvolává relativní hypoxii perivenulární (pericentrální) oblasti, která je náchylná k nekróze buněk. Indukovaný CYP2E1 může aktivovat kancerogeny a hepatotoxiny přeměnou na toxicější metabolity. Zvýšeným metabolismem pro organismus významných „alkoholů“, např. některých*



*vitaminů (vitamín D, retinol), se může rozvinout jejich deficit. Vedlejším produktem oxidace prostřednictvím CYP2E1 je tvorba kyslíkových radikálů.“ [19].*

Volné radikály se také generují při metabolismu ethanolu, např. systém xanthinoxidoreduktázy, při fagocytární migraci, avšak zejména systémem CYP2E1. Lipoperoxidace a tvorba superoxidu vzájemně souvisí s množstvím CYP2E1. Aldehydy, které vznikají lipoperoxidací, jsou substrátem pro A1DH. Mohou tedy působit jako účinný kompetitivní nebo smíšený inhibitor oxidace jaterních aldehydů cestou A1DH, což má za následek zvýšení hepatocelulární toxicity aldehydů jako jeden z možných patobiochemických faktorů jaterních onemocnění.

Kataláza má nejméně významnou roli v metabolismu ethanolu, její lokalizace je v peroxisomech s popisovanou aktivitou pro oxidaci etanolu [19].

## **2.5 Patologické změny jater vlivem alkoholu**

Mezi nejčastější morfologické změny jater vlivem alkoholu se zařazují steatóza jater (tuková játra), alkoholická hepatitida a cirhóza.

### **2.5.1 Steatóza jater**

Hlavním morfologickým rysem steatózy je hromadění triacylglycerolů v cytoplazmě hepatocytů, a to ve formě tukových vakuol. Na počátku jsou tukové vakuoly pozorovány v perivenulární zóně (zóna 3). Později se vakuoly zvětšují a difúzně přecházejí v ostatní zóny. Ztrácejí membránu a vzájemně splývají [20,21].

#### **Makrovezikulární steatóza**

V cytoplazmě hepatocytu se obvykle objevuje jedna velká vakuola, která vytlačuje jádro na okraj. V počátcích se tento typ vyskytuje v zónách 2 a 3 jaterního acinu, později postihuje všechny zóny. Steatóza však mizí po vysazení alkoholu, a to po 4–8 týdnech.

#### **Mikrovezikulární steatóza**

Způsobuje jí porucha beta-oxidace mastných kyselin v mitochondriích. Na rozdíl od makrovezikulární steatózy se jádro nachází bez dislokace na periférii a cytoplazma obsahuje mnoho drobných tukových vakuol. U alkoholického postižení je méně častá, patří spíše mezi záležitost vlivem léků. Vyskytuje se opět v zónách 2 a 3 [21].

## 2.5.2 Alkoholická hepatitida

Alkoholická hepatitida je tzv. forma neinfekční, která na rozdíl od infekční hepatitidy (způsobují viry) vzniká působením alkoholu a jedů. Výskyt hepatitidy může být samostatný nebo v kombinaci s již vytvořenou cirhózou. Relativně vzácný je plný obraz floridní, akutní a alkoholické hepatitidy. Existují však všechny stupně závažnosti.

Balonová degenerace. Granulární cytoplazma, která se často rozptyluje do jemných vláken, zvětšuje objem hepatocytů. Jádro je hyperchromatické a malé. Steatóza je obvykle makrovezikulární, někdy však objevujeme některé mikrovezikulární změny. V důsledku retence vody a poruch mikrotubulárního vylučování proteinu z hepatocytu dochází ke zvětšování objemu.

Acidofilní tělíska charakterizují apoptózu.

Malloryho tělíska můžeme vidět pomocí barvení hematoxylin-eosin jako purpurově rudé intracytoplazmatické inkluze. Jasněji viditelné mohou být pomocí barviva Massonovy trichromové nebo chromofobní anilinové modři. Skládají se ze shluku organel, většinou z intermediálních vláken. Jejich cílem je destrukce hepatocytu [22].

Obrovské mitochondrie tvořící intracytoplazmatické shluky, které můžeme vidět ve světelném mikroskopu s použitím Massonova trichromového barviva.

Sklerotizující hyalinní nekróza. Nejvíce postižena je zóna 3, zde se usazuje nejvíce kolagenu. Perisinusoidální vlákna obklopují velkoobjemové či normální hepatocyty. Pórovitost a počet sinusoidálních stěn jsou redukovány. Tyto změny omezují výměnu látek mezi plazmou a buněčnou membránou hepatocytů.

Změny portální zóny nejsou příliš nápadné a mírný chronický zánět je vidět pouze u pokročilých případů.

Cholestáza nacházející se ve žlučových kanálcích je znakem všech druhů alkoholického onemocnění jater.

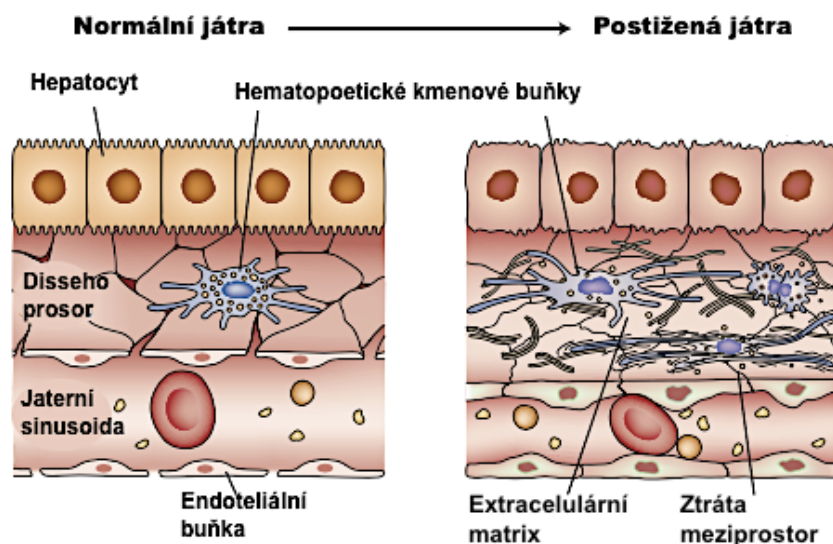
U osob, které omezí svou spotřebu alkoholu, se vyvíjejí tzv. hyperplastické uzlíky [22].

*„Histologické vzorky tvoří spektrum od minimálních alkoholických hepatitid až k pokročilému, pravděpodobně ireverzibilnímu obrazu, na kterém je nekróza rozsáhlejší a vytvářejí se jizvy. Alkoholická hepatitida je předchůdcem cirhózy.“ [22].*

### 2.5.3 Cirhóza

Jaterní cirhóza je označena jako skupina jaterních chorob s rozsáhlým zánikem parenchymu, zmožením vaziva a uzlovitou hyperplazií jaterní tkáně. Alkoholická cirhóza se nejčastěji vyskytuje u mužů ve věku 50-60 let, může se však vyskytnout i v jiném věku. Makroskopicky můžeme vidět značný rozdíl velikosti jater, játra jsou zmenšena až o 800 g. Na řezu je orgán složen z nepravidelných uzlů o různé barvě. Vyjímají se zde barvy od žlutavé přes hnědou až po zelenou. Nejčastěji však bývají uzly barvy žlutavé, odtud také odvozený název cirhóza (kirros – žlutý) [23].

Cirhóza se u alkoholika může vyvinout z fibrózy a to bez zprostředkování akutní alkoholickou hepatitidou. Přesný mechanismus je nejasný. Kyselina mléčná sice zvyšuje fibrogenezi, ale zdá se nespécificky spojená s jakýmkoli druhem těžkého jaterního onemocnění. Vznik fibrózy nastává vlivem transformace hvězdicových buněk (Itovy buňky, lipocyty) na fibroblasty a myofibroblasty [22].



Obrázek 7 : Změna postižených jater. Upraveno. [24].

Hlavním stimulem pro tvorbu kolagenu je buněčná nekróza, ale existují i další možnosti stimulace. Mezi ně patří například hypoxie zóny 3 nebo také zvýšený tlak vlivem zvětšení hepatocytu. Produkty, které degradují z peroxidace lipidů, motivují hvězdicové buňky k tvorbě kolagenu.

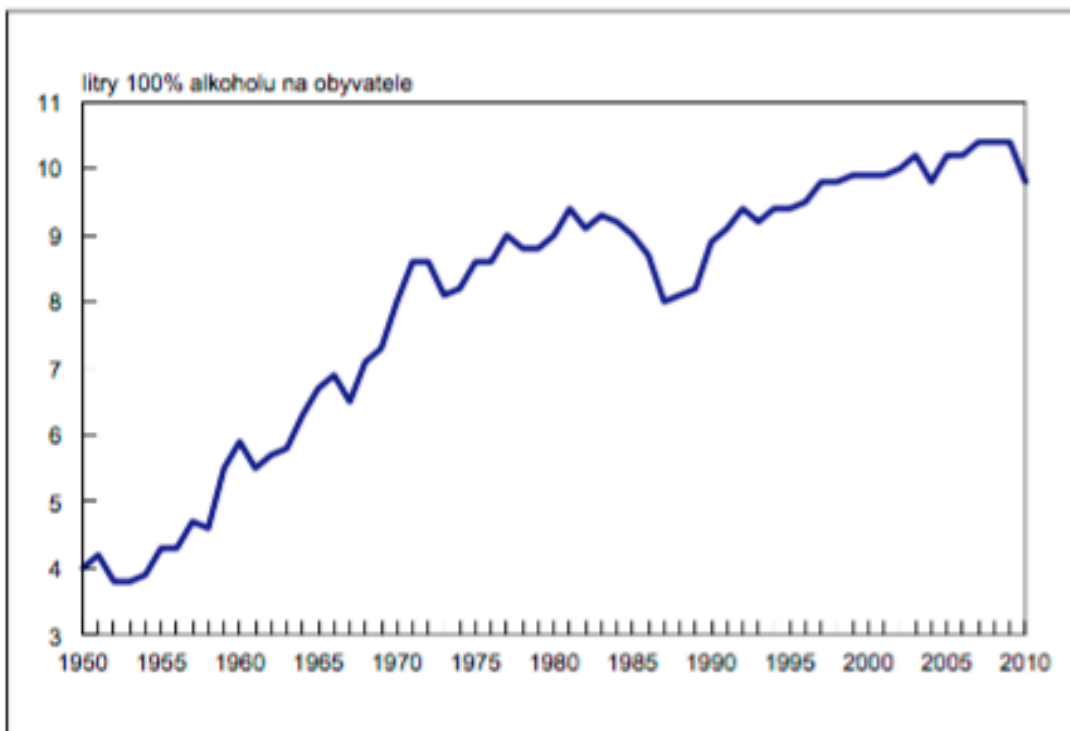
Alkoholická cirhóza je v klasické podobě mikronodulární. Zonální architektura je k nepoznání, venuly zóny 3 lze najít jen obtížně [22]. Oproti normálním jaterním acinům postrádá cirhotický parenchym radiálně uspořádané jaterní trámce. Vény, které odpovídají

centrálním žilám normálního lobulu, jsou uloženy excentricky, v některých případech až při periférii cirhotických uzlíků. Z tohoto důvodu se tyto uzly označují jako pseudolobuly. Vazivo oddělující pseudolobuly vzniká především proliferací vaziva portálních polí. Mezi pseudolobuly se mohou tvořit různě široké pruhy [23].

*„Spokračující nekrózou a náhradou fibrózy se může cirhóza vyvíjet od mikro-  
k makronodulární formě, ale je to obvykle doprovázeno omezením steatózy. Když se  
dosáhne obrazu tohoto konečného stadia, je obtížné potvrdit alkoholickou etiologii na  
základě histologie“ [22].*

#### 2.5.4 Alkohol v České republice

Spotřeba alkoholu v České republice patří mezi vyšší příčky ve srovnání s ostatními zeměmi Evropské unie. Odhaduje se na 16,6 litru čistého alkoholu na obyvatele ve věku 15 let a vyšším. Výsledky dotazovaných vyšetření dokazují, že každý pátý dospělý pije zdravotně rizikovým způsobem ( 26% mužů, 13% žen), přičemž míra abstinence je velmi nízká (5% dospělých) [25].



Obrázek 8 : Vývoj spotřeby alkoholu na obyvatele v přepočtu na 100% alkohol dle údajů Českého statistického úřadu [25].

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce je problematika patologie jater vlivem alkoholu. Požíváním velkého množství ethanolu se mění kompletní struktura jater, která má za následek jejich špatnou nebo nulovou funkci.

Hlavního cíle dosáhneme pomocí vytvoření histologických preparátů, které má několik dílčích kroků. Pro zviditelnění tkáně je důležité barvení. Každá struktura a buňka má rozdílnou schopnost vázat barvivo. Před samotným barvením předchází několik kroků, které jsou pro zhotovení preparátu důležité. Prvním a nejdůležitějším krokem, od kterého se vše odvíjí, je získání samotné tkáně. V případě jater, kdy postačí malá část, se může jednat o biopsii i nekropsii. Od odebrání vzorku po samotné pozorování preparátu se uskuteční několik kroků. Prvním krokem bude fixace, po které nastává odvodnění a samotné zalévání tkáně do parafinových bločků. Zalévání do parafinu je důležité pro uskutečnění krájení tenkých řezů, které následně procházejí procesem deparafinace. Teprve po takto připravených řezech je možné tkáň obarvit několika barvicími metodami. Po obarvení nastává poslední krok odvodnění a montování řezů.

Cílem této práce je dosáhnout viditelného rozdílu zdravých a nemocných jater postižených cirhózou a steatózou. Preparáty jsou zhotoveny několika barvicími metodami pro dokonalé znázornění každé struktury tkáně.

## **4 METODIKA**

### **4.1 Odběr a fixace vzorku**

Po odebrání vzorku z živé tkáně (biopsie) či z mrtvého organismu ( nekropsie) je nutné biologický materiál fixovat. Fixace zabraňuje činnosti enzymů, která vede k autolýze (samonatravení) buněk. Ta by měla za následek porušení struktury a barvitelnosti vzorku. Podle způsobu, kterým pracují enzymy, vyplývají dva možné přístupy k fixaci : fyzikální a chemický [26].

Tkáně potřebné k vytvoření preparátu byly odebrány pověřenou osobou v příslušném patologickém ústavu 1. LF UK. Materiál byl ihned uložen do 10% roztoku formolu. Postupovalo se tedy fixací chemickou. Tímto způsobem byly získány tři tkáňové bločky jater : postižené cirhózou, steatózou a zdravá tkáň.

### **4.2 Zalévání do parafínu**

Pro vizualizaci tkáně je zapotřebí odebraný a fixovaný materiál nakrájet na tenké řezy o tloušťce 6 –10  $\mu m$ . Vzorek není možné krájet přímo po fixaci, nýbrž musí být zalit do zalévacího media. Jako zalévací medium se nejčastěji využívá ve vodě nerozpustný parafín. Před prosycením vzorku parafínem předcházejí dva postupy, odvodnění a prosycení vzorku intermediem.

#### **Odvodnění**

Voda obsažená ve vzorku musí být nahrazena odvodňovacím mediem. Nejčastěji se používají roztoky ethanolu ve stoupajících koncentracích, tzv. vzestupná řada alkoholů (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%). Počáteční koncentrace ethanolu závisí na obsahu vody ve vzorku. [26].

#### **Prosycení intermediem**

Vzhledem k tomu, že parafín není rozpustný v ethanolu, je nutné tkáň prosytit intermediem (benzenem). Látkou, která je smísitelná s alkoholem a zároveň s parafínem. Intermedium nahradí alkohol obsažený ve vzorku a umožní průnik tkání zalévacímu mediu.

## **Prosycení parafínem**

Před samotným zalitím do parafínu je nutné tkáň prosytit parafínem, aby nedocházelo k poškození tkáně v průběhu krájení řezů. Tkáňové bločky vložíme do lázně s parafínem při teplotě 56° C. Tuto lázeň provedeme 3krát po dobu několika hodin (18 h, 6 h, 4 h).

## **Vlastní zalití do parafínu**

Tkáňové bločky prosycené parafínem vyjmeme z parafínové lázně a umístíme do papírové komůrky, která odpovídá velikosti tkáně. Komůrku začneme opatrně zalévat rozpuštěným parafínem o teplotě 58 °C až po okraj. Po ztuhnutí parafínu oddělíme papírovou komůrku a parafínový bloček ořízneme do tvaru pyramidy. Pro uchycení do mikrotomu je zapotřebí připevnit bloček k dřevěnému špalíčku a nechat chvíli ztuhnout. Důležité je řádně si vše číselně označit, abychom mohli správně identifikovat, jaká tkáň se v bločku nachází.

## **4.3 Krájení řezů**

Samotnému krájení řezů předchází příprava podložního sklíčka. Sklíčka opatříme tzv. adhezivní vrstvou, která zabraňuje větší deformaci, roztržení nebo uplávání řezů během barvení. Adhezivní vrstvu vytvoříme pomocí vaječného bílku s glycerolem (v poměru 1:1), který jemně rozetřeme na podložní sklíčko. Bloček uchytíme do držáku rotačního mikrotomu a nastavíme tloušťku řezů na 8  $\mu\text{m}$ . Plynulým pohybem krájíme řezy, které pomocí štětečku a laboratorní jehly opatrně přikládáme na podložní sklíčko. Pro vypnutí řezu přikápneme na podložní sklíčko kapku destilované vody a umístíme ho na elektrickou ploténku vyhřátou na 38° C. Po odpaření vody a vypnutí řezu sklíčko popíšeme a do druhého dne umístíme do termostatu.

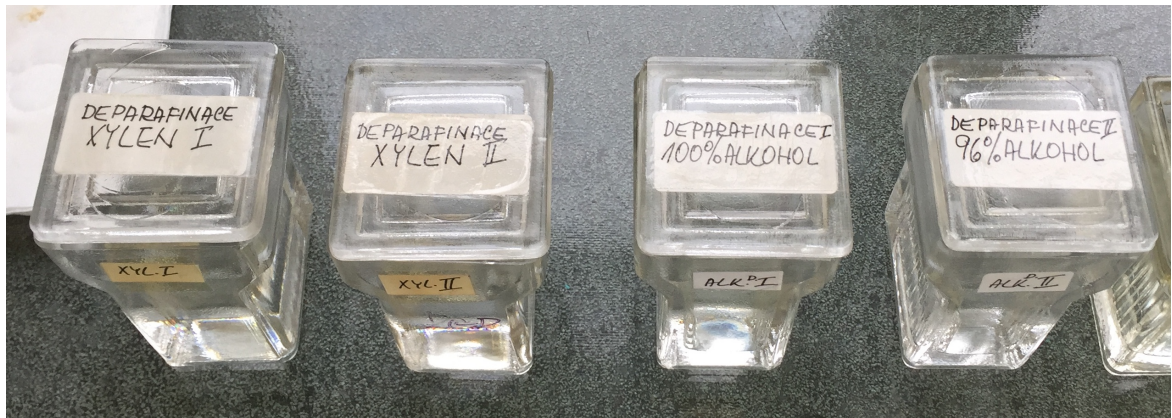
## **4.4 Deparafinace**

Jelikož je parafín ve vodě nerozpustný, nebylo by možné tkáň s parafínem dobře obarvit. Proto je nutné před samotným barvením řezy deparafinovat.

Sklíčka s řezy umístíme do první lázně xylenu I po dobu 5 min., poté sklíčka vyjmeme jedno po druhém a vložíme do druhé lázně obsahující xylen II. Po 5 min. opět přendáme sklíčka do další kyvety, která obsahuje 100% alkohol (ethanol). Opět po 5 min. přendáme sklíčka do další kyvety s 96% alkoholem po dobu 5 min. Mezi jednotlivými lázněmi vždy

sklíčko opatrně otřeme hadříkem, tkáň však nesmí vyschnout. Naposledy přendáme sklíčka do kyvety s vodou a přeneseme kyvetu pod tekoucí vodu (cca 5 min.). Proud tekoucí vody musí být mírný a neměl by dopadat přímo na sklíčka, řezy by se proudem vody mohly zničit.

- Xylen I ..... 5 min
- Xylen II ..... 5 min
- 100% ethanol ..... 5 min
- 96% ethanol ..... 5 min
- praní pod tekoucí vodou ..... 5 min



Obrázek 9 : Deparafinace (Tereza Hrubcová, 2017), zleva : Xylen I, Xylen II, 100% ethanol, 96% ethanol.

## 4.5 Barvení

Tkáňový řez napnutý na podložním sklíčku má obvykle bělavou barvu, která není v mikroskopu příliš viditelná. Jednotlivé struktury nerozpoznáme, protože mají stejný index lomu. Pomocí barvicích metod můžeme rozeznat jednotlivé struktury. Každé barvivo je schopno se vázat na určitou strukturu či buňky, proto jsou struktury tkání po obarvení dobře rozeznatelné [26].

### 4.5.1 Barvení hematoxylin-eosin

Hematoxylin je nažloutlý krystalický prášek rozpustný ve vodě nebo v alkoholu. Sám o sobě nemá barvicí vlastnost, teprve po oxidaci, kdy se mění na hematin. Ale ani hemateinem nemůžeme barvit přímo, nýbrž musíme připravit tzv. barevný lak hematinu přidáním mořidla (např. síran draselný, železitý). V histologické technice se vždy hovoří



o barvení hematoxylinem, i když se jedná o barvení barevným lakem, v němž je hematoxylin oxidován na hematein [26].

Ihned po deparafinaci umístíme sklíčka s řezy do barvicí kyvety s hematoxylinem po dobu 3-10 min. dle intenzity. Po obarvení pereme řezy ve vodě přibližně 10 min., po jednom sklíčku diferencujeme v kyselém alkoholu pouhým namočením za kontroly v mikroskopu. Jádra by měla získat hnědou barvu. Po kontrole jader přesuneme všechna sklíčka s řezy do kyvety s vodou a pereme pod tekoucí vodou 10 min. Jádra během praní získávají černou barvu. Poté řezy namočíme do 2% NaHCO<sub>3</sub> a pereme ve vodě. Destilovanou vodu používáme vždy před každým roztokem, abychom zabránili jeho zředění. Vlivem hydrogenuhličitanu zmodrají jádra. Pro konečné obarvení umístíme řezy na 5 min. do kyvety s 0,5% eosinem. Připravíme si alespoň 4 kyvety a řezy po obarvení řádně propereme, jelikož je eosin velmi agresivní barva (viz obrázek10).

- Harrisův hematoxylin ..... 3-10 min
- Praní ve vodě ..... 10 min
- Kyselý alkohol (HCl) ..... namočit
- Praní ve vodě ..... 10 min
- 2% NaHCO<sub>3</sub> ..... namočit
- Praní ve vodě ..... 5 min
- 0,5 % roztok eosinu ..... 5 min
- Oplach ve vodě ..... 4 kyvety



Obrázek 10 : Eosin, oplach vodou (Tereza Hrubcová, 2017).



Obrázek 11 : Hematoxylin - eosin (Tereza Hrubcová, 2017). Zleva : hematoxylin, kyselý alkohol, 2%  $\text{NaHCO}_3$  , eosin, destilovaná voda.

### Příprava roztoků

Harrisův hematoxylin – kupuje se, před použitím by měl být přefiltrován

Roztok eosinu – 0,5 % roztok v destilované vodě. (5 g eosinu, 1000 ml vody)

Kyselý alkohol – 3-5 kapek  $\text{HCl}$  do 100 ml 70% alkoholu

2%  $\text{NaHCO}_3$  – 2% vodný roztok  $\text{NaHCO}_3$  v destilované vodě (20 g, 1000 ml vody)

### Výsledky barvení

Jádra buněk a chrupavka se obarví modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

#### 4.5.2 PAS reakce – průkaz polysacharidů

Základní reakcí k průkazu polysacharidů je PAS reakce (zkratka složená z počátečních písmen názvů reagensů, použitých při této reakci : Periodic Acid a Schiffovo činidlo). Podstatou reakce je oxidace polysacharidů, při které vznikají volné aldehydy, které reagují s Schiffovým činidlem za vzniku fialově červeného zbarvení v místě glykogenu [26].

Ihned po deparafinaci umístíme sklíčka s řezy do kyvety s kyselinou jodistou po dobu 60 min. Poté řezy opláchneme pod tekoucí vodou. Po opláchnutí přemístíme řezy do kyvety se Schiffovým činidlem a umístíme do tmy na 20 min. Po reakci opláchneme řezy ve vodě přibližně 5 min. a zkontrolujeme řezy v mikroskopu, zdali mají růžovofialové zbarvení. Po oxidaci přichází barvení Harrisovým hematoxylinem. Barvení probíhá přibližně 1 min., může ale trvat i 3-10 min., podle obarvení. Červené zbarvení jader kontrolujeme v mikroskopu po oplachu vodou. Posledním krokem reakce je diferencování v kyselém alkoholu, po jednom sklíčku diferencujeme pouhým namočením. Řezy umístíme do kyvety s vodou a pereme 5-10 min. pod tekoucí vodou do zmodrání jader. Následně řezy krátce namočíme v roztoku 2% NaHCO<sub>3</sub> a opět pereme pod tekoucí vodou.

- Kyselina jodistá ..... 60 min
- Oplach ve vodě ..... 3 kyvety
- Schiffovo činidlo ..... 20 min
- Praní ve vodě ..... 5 min
- Harrisův hematoxylin ..... 1 min
- Oplach ve vodě ..... 1 min
- Kyselý alkohol ..... namočit
- Praní ve vodě ..... 5-10 min
- 2% NaHCO<sub>3</sub> ..... namočit
- Praní ve vodě ..... krátce



Obrázek 12 : PAS reakce (Tereza Hrubcová, 2017). Shora : Deparafinace, PAS reakce, odvodnění, projasnění.

### **Příprava roztoků**

Kyselina jodistá –  $\text{HIO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,4 g) + 70-96% alkohol (35 ml) + 5M octan sodný (5ml) + destilovaná voda 10 ml. Roztok uchováváme v temnu.

Octan sodný – 27,2 g octanu se rozpustí ve 1000 ml destilované vody

Schiffovo činidlo – čirý roztok, který se uchovává ve tmě a chladu. Zakoupit je možné v lékárně.

### **4.5.3 Zelený trichrom**

Barvení trichromem se využívá především k vyšetření kolagenního vaziva. Podle toho, jak se vazivo barví, rozeznáváme tři druhy trichromů :

1. Trichrom žlutý
2. Trichrom modrý
3. Trichrom zelený

Opět ihned po deparafinaci přemístíme řezy do první kyvety obsahující Weigertův železitý hematoxylin, zde řezy ponecháme 3-5 min. a následně zkontrolujeme v mikroskopu. Poté řezy důkladně pereme pod tekoucí vodou 8-10 min. Následuje diferencování v kyselém alkoholu, kde řezy pouze namočíme. Opět pereme řezy pod

tekoucí vodou 5 min. Dalším krokem je barvení v roztoku červeně po dobu 3-4 min. za kontroly v mikroskopu. Následně řezy 3-4 x opláchneme ve vodě a přemístíme do destilované vody. Další fází barvení je tzv. moření, kdy první kyveta obsahuje 1% kys. fosfowolframovou (5 min.). Po tomto kroku se červeně projasní a vazivo odbarví. Řezy opět opláchneme 3-4krát. Poté řezy přemístíme do kyvety obsahující zeleň světlou (3-4 min.). Znovu opláchneme a diferencujeme 2% kys. octovou. Nakonec řezy propereme ve vodě, přibližně 3-4 kyvety.

- Weigertův železitý hematoxylin ..... 3-5 min
- Praní ve vodě ..... 8-10 min
- Kyselý alkohol ..... namočit
- Praní ve vodě ..... 5 min
- Roztok červeně ..... 3-4 min
- Oplach ve vodě ..... 3-4 kyvety
- 1% kys. fosfowolframová ..... 5 min
- Oplach ve vodě ..... 3 kyvety
- Zeleň světlá ..... 3-4 min
- Oplach ve vodě ..... 3-4 kyvety
- 2% kyselina octová ..... namočit
- Oplach ve vodě ..... 3-4 kyvety



Obrázek 13 : Zeleň světlá, oplach vodou. (Tereza Hrubcová, 2017).



Obrázek 14 : Zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017).

### Příprava roztoků

Weigertův železitý hematoxylin – roztok A+B v poměru 1:1

- roztok A : 1 % hematoxylin v 96% alkoholu.
- Roztok B : 0,6 g  $\text{FeCl}_3$  + 0,75 ml HCl + 95 ml destilované vody

Roztok červeně – A + B + C + destil. voda (15 ml + 15 ml + 15 ml + 40 ml)

- roztok A : 1 g ponceau de xylidine do 100 ml destilované vody. Zahřát ve vodní lázni, po přefiltrování a zchlazení se přidá 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- roztok B : 1 g kys. fuchsin do 100 ml destilované vody, zahřát na vodní lázni, po přefiltrování a zchlazení se přidá 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- roztok C : 1 g oranž G do 100 ml destilované vody, zahřát na vodní lázni, po přefiltrování a zchlazení se přidá 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Roztok světlá zeleň – 2 g světlé zeleně do 100 ml 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$

1% kyselina fosfowolframová – 1 g do 100 ml destilované vody

2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 2 ml do 100 ml destilované vody

### Výsledky barvení

Jádra – hnědočerná, vazivo – zelené, svaly – červené, erytrocyty – oranžové

#### 4.5.4 Barvení Azanem

Odparafinované řezy barvíme po dobu 20 min. v roztoku azokarmínu, květu s řezy umístíme do termostatu při teplotě 58° C. Řezy opláchneme destilovanou vodou a diferencujeme 10 vteřin v anilínovém alkoholu za kontroly v mikroskopu. Jádra dostávají ostře červené zbarvení na růžovém podkladě (viz obrázek 15). Diferencování přerušíme opláchnutím řezu v kyselém alkoholu. Poté řezy moříme 20 vteřin v 5% roztoku kyseliny fosfowolframové. Krátce řezy opláchneme v destilované vodě a barvíme anilínovou modří a oranž G po dobu 8 min. Následně řezy umístíme do vody alespoň na 10 min. Opláchnuté řezy od přebytku barviva diferencujeme v 96% alkoholu.

- Azokarmín ..... 20 min (58°C)
- Oplach d. vodou ..... oplach
- Anilínový alkohol ..... 10 s
- Kyselý alkohol ..... oplach
- kys. fosfowolframová ..... 20 s
- oplach vodou ..... oplach
- anilínová modř + oranž G ..... 8 min
- Oplach vodou ..... 10 min
- 96 % alkohol ..... krátce



Obrázek 15 : Barvení Azan. (Tereza Hrubcová, 2017).



Obrázek 16 : Řezy obarvené azokarmínem v destilované vodě. (Tereza Hrubcová, 2017).

### **Příprava roztoků**

Azokarmín – 0,1 g azokarmínu do 100 ml destilované vody. Zahřát ve vodní lázni, po přefiltrování a zchladnutí se přidá 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Anilínová modř a Oranž G – 0,5 g anilínové modře, 2 g oranže G a 1 g kyseliny fosfowolframové do 100 ml destilované vody. Okyselíme přidáním 8 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , svaříme a po zchladnutí přefiltrujeme. Před upotřebením ředíme v poměru 1 : 1 s destilovanou vodou.

Anilínový alkohol – 1 ml anilínového oleje do 1000 ml 96% alkoholu.

Kyselý alkohol – 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do 100 ml 96% alkoholu.

### **Výsledky barvení**

Jádra – karmínově červené, erytrocyty – oranžově červené, kolagenní vazivo – modré, svalstvo – červeně.

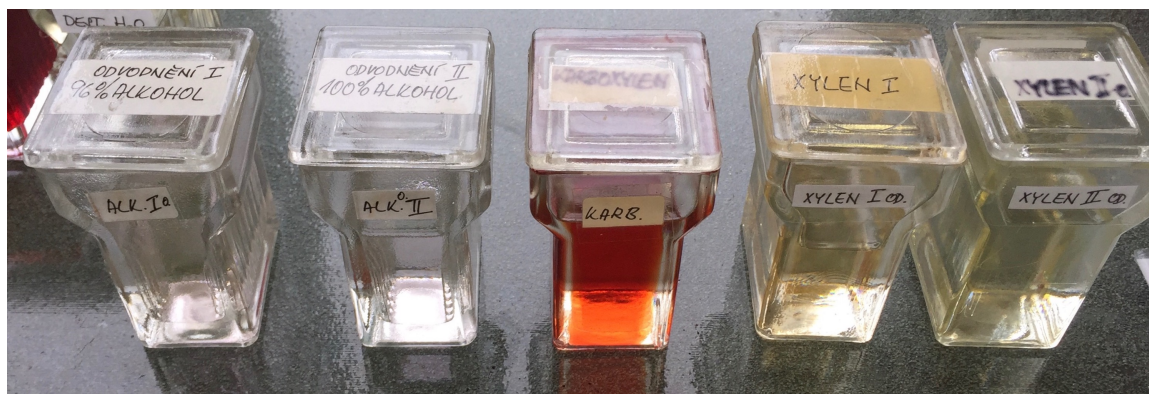


## 4.6 Odvodnění, projasnění a montování

Odvodnění provádíme vždy po barvení, jelikož barviva jsou na vodní bázi. Tkáň tedy pomocí alkoholů odvodníme. Vždy postupujeme stejně. První kyveta, do které umístíme řezy, obsahuje 96% roztok ethanolu. Preparáty jsou zde krátkou dobu, pouze je namočíme a ihned přemístíme do druhé kyvety se 100% alkoholem, zde řezy opět jen namočíme. Dalším krokem je lázeň v karbol-xylenu, kde řezy ponecháme po dobu 5 min. Předposlední kyveta obsahuje xylen I, zde necháme řezy na dalších 5 min. Naposled sklíčka přemístíme do xylenu II (5 min).

Po odvodnění a projasnění řezů přichází montování. Připravíme si krycí sklíčka, které položíme na kraj stolu a na každé z nich kápneme malé množství montovacího media DePeX. Následně vyjmeme jedno sklíčko z kyvety, lehce osušíme hadříkem a přiložíme na krycí sklíčko s obsahem DePeX. Obarvená tkáň musí celá zakryta a montovací medium po celé šíři krycího sklíčka. Pomocí laboratorní jehly vytlačíme z media bublinky, které by překáželi při sledování preparátu. Takto zamontujeme všechny preparáty a zkontrolujeme pod mikroskopem, zdali se ještě někde nevyskytují bublinky. Montovací medium musí pořádně zaschnout, sklíčka s řezy tedy umístíme do termostatu na 37° C do druhého dne. Hotové preparáty důkladně očistíme žiletkou, od přebytečného montovacího media.

- 96 % ethanol ..... namočit
- 100 % ethanol ..... namočit
- karbo-xylen ..... 5 min
- Xylen I ..... 5 min
- Xylen II ..... 5 min
- DePeX ..... kapka na krycí sklíčko

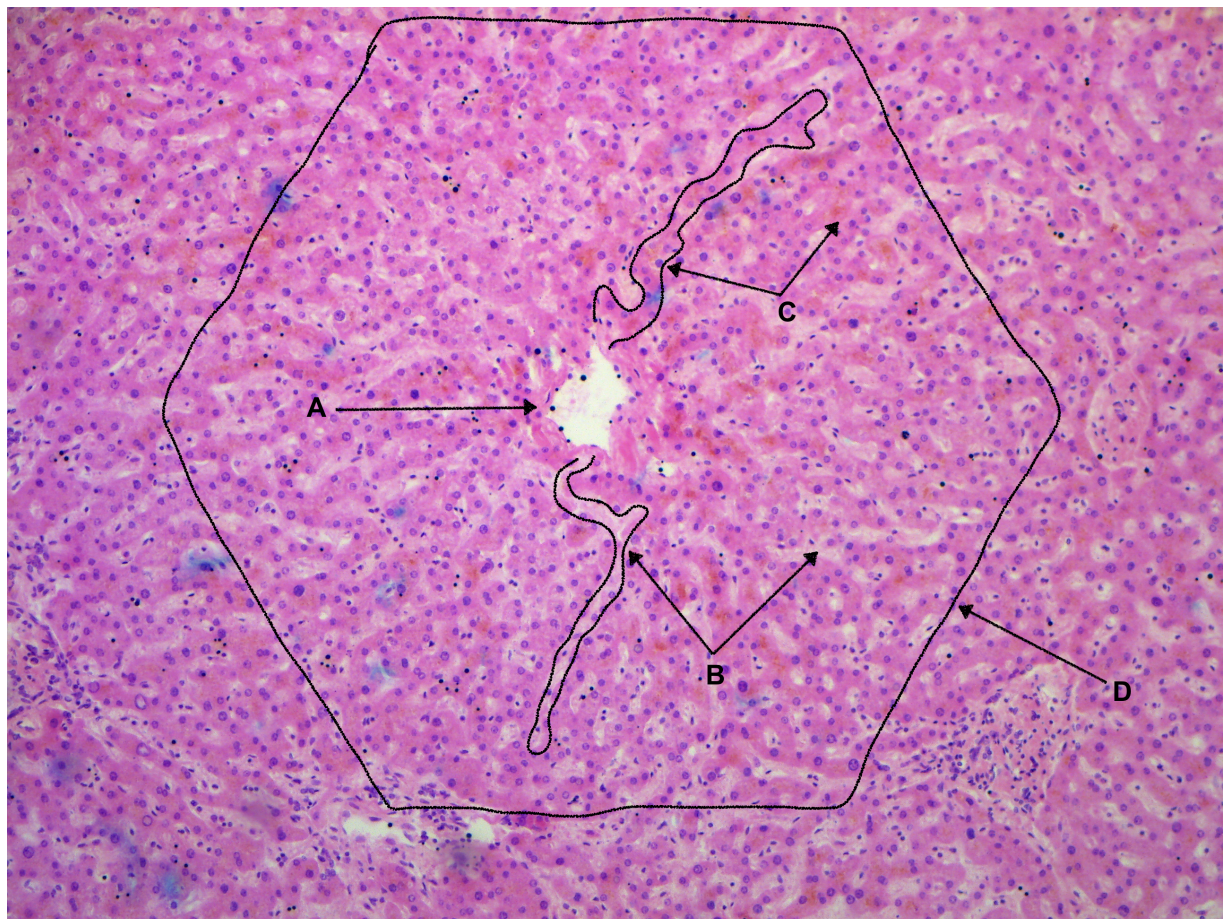


Obrázek 17 : Odvodnění a projasnění. (Tereza Hrubcová, 2017).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Barvicí metoda hematoxylin- eosin

#### Zdravá játra – lalůček centrální vény

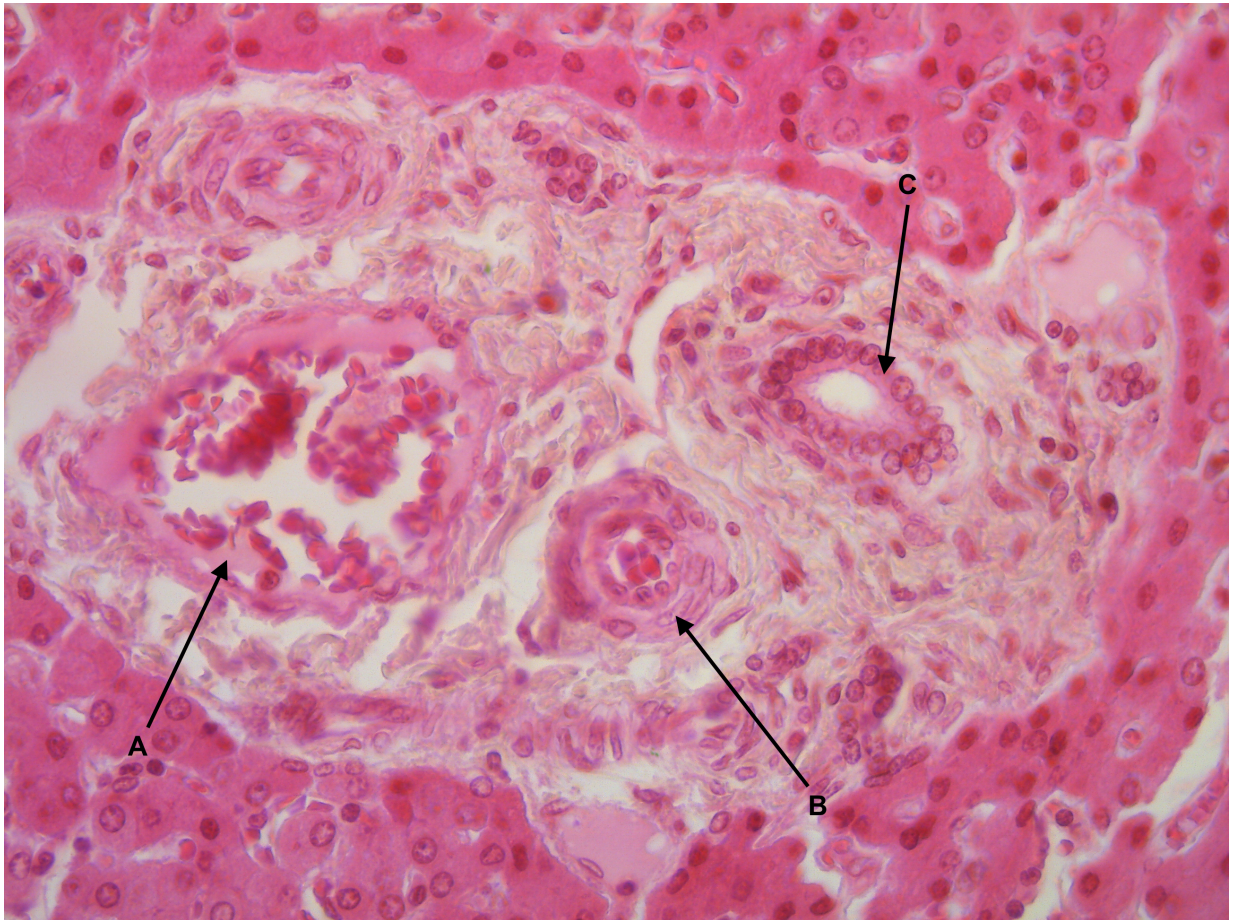


Obrázek 18 : Lalůček centrální vény zdravých jater. Zvětšeno 10x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Vena centralis
- B. Sinusoidy
- C. Trámce hepatocytů
- D. Lalůček centrální vény

- Lalůček centrální vény se vyskytuje nejčastěji jako šestiboký útvar, který svým periodickým opakováním tvoří jaterní parenchym. Jeho střed vždy tvoří centrální véna. Do středu lalůčku se radiálně sbíhají trámce hepatocytů a spolu s nimi jaterní sinusoidy.

## Játra – portobiliární prostor

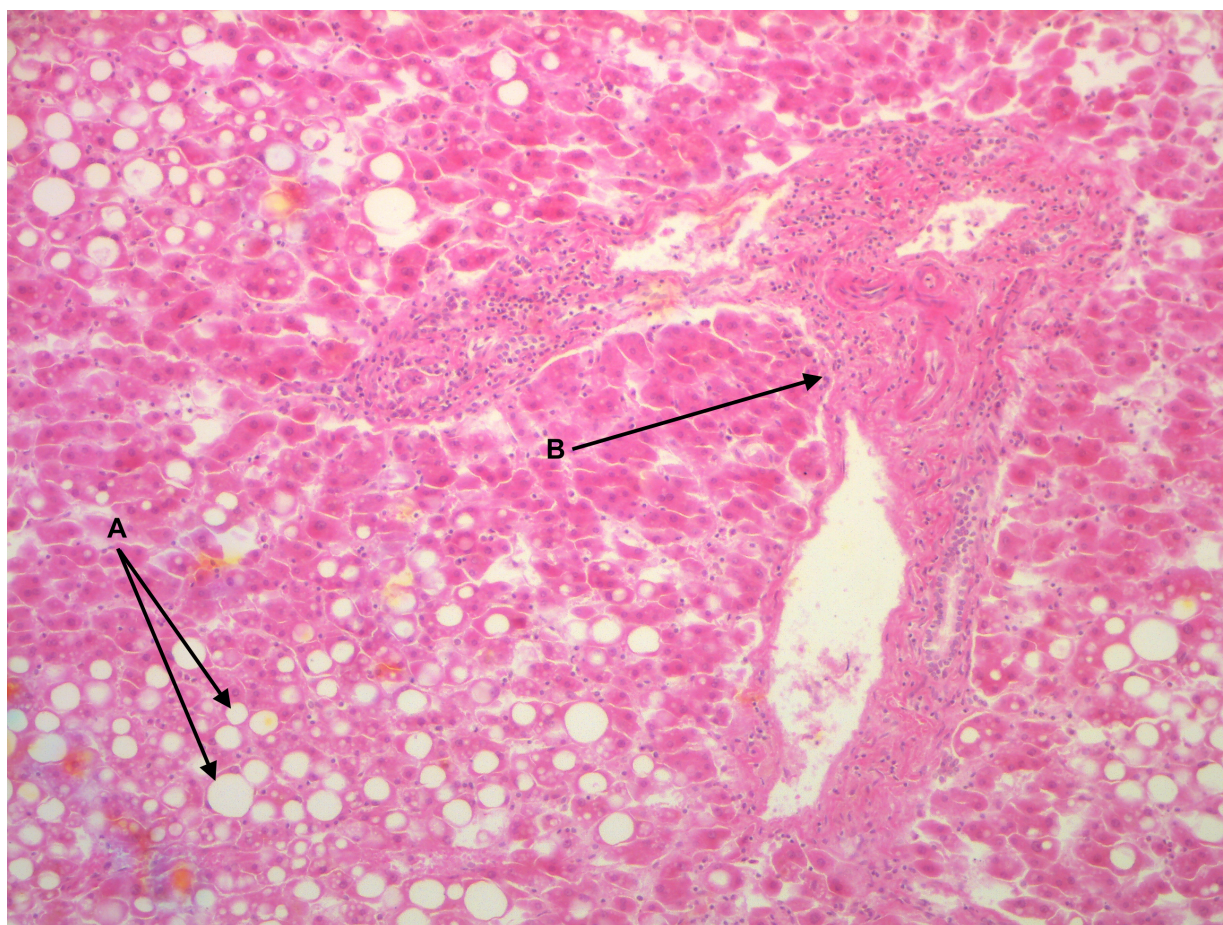


Obrázek 19 : Portobiliární prostor. Zvětšeno 40x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Interlobulární véna
- B. Interlobulární arterie
- C. Interlobulární žlučovod (jednovrstevný kubický epitel)

- Portobiliární prostor se nachází na periferii jaterního lalůčku. Skládá se z interlobulární vény, která přivádí živiny s trávicí trubice. Okysličená krev přichází pomocí interlobulární arterie a žluč je odváděna z lalůčků interlobulárním žlučovodem. V pozadí za vrstvičkou vaziva oddělující portobiliární triádu se nacházejí hepatocyty s červenými jádry.

## Postižená játra – steatóza, portobiliární prostor



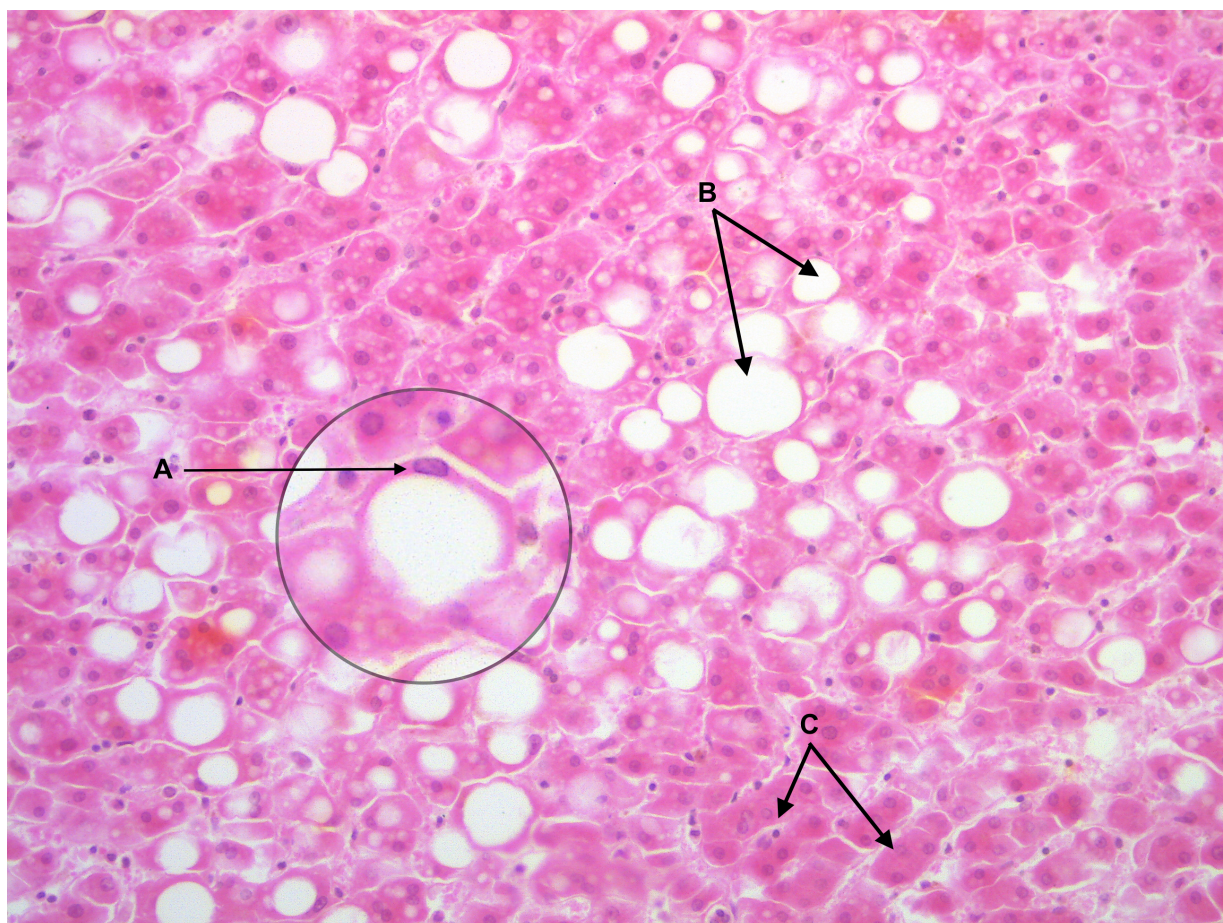
Obrázek 20 : Játra postižené steatózou. Zvětšení 10x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

A. Kapénky lipidů

B. Portobiliární prostor

- Na první pohled můžeme sledovat velké množství tukových vakuol, které nahrazují cytoplazmu hepatocytů. Trámce hepatocytů jsou nepravidelné a portobiliární prostor nemá svůj charakteristický tvar.

## Steatóza – kapénky lipidů



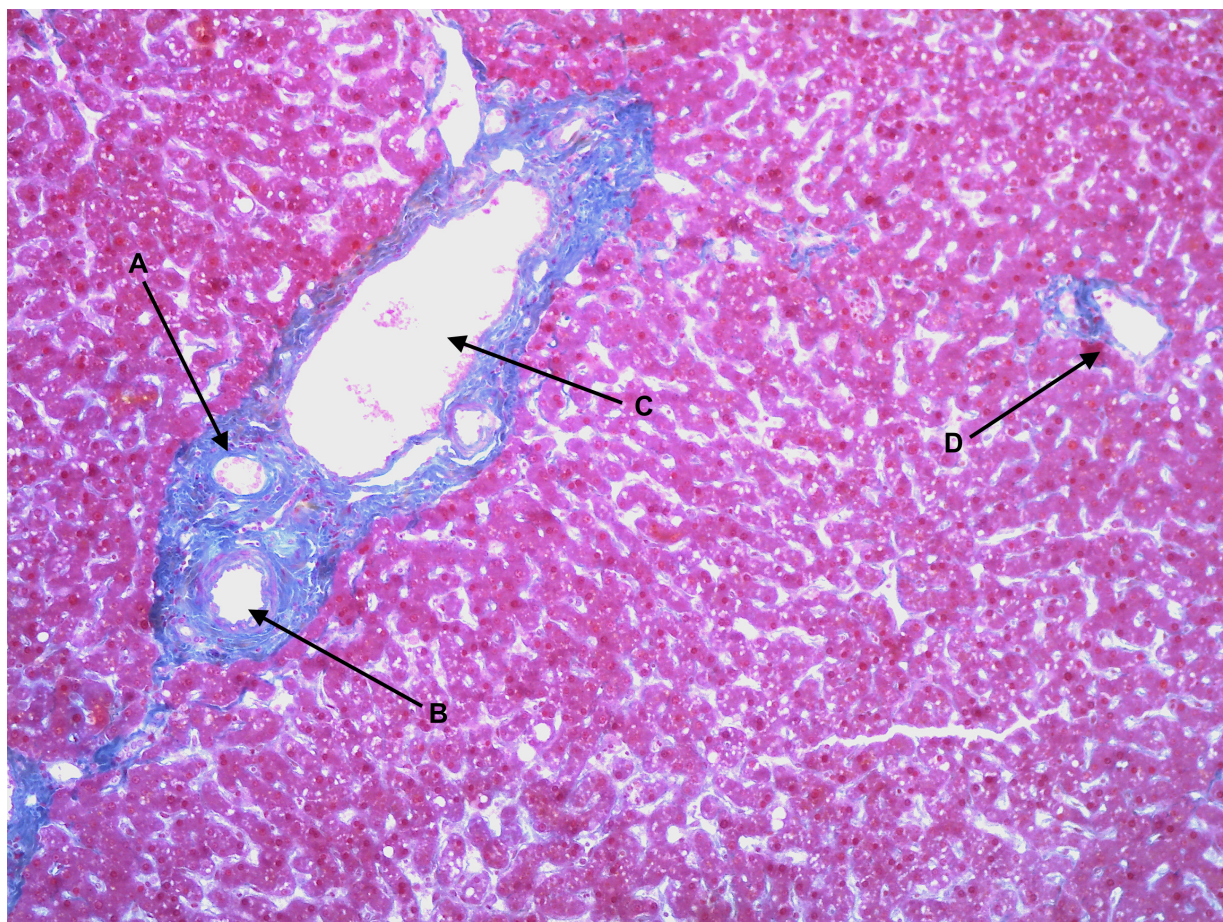
Obrázek 21 : Velkokapénková steatóza. Zvětšeno 20x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Jádro hepatocytu vytlačené mimo střed
- B. Kapénky lipidů
- C. Zbytky hepatocytů

- Velkokapénková steatóza se vyznačuje velkou tukovou kapénkou v buňce (hepatocytu), která vytlačuje jádro mimo střed k periferii buňky. Zde se podařilo tento poznatek potvrdit.

## 5.2 Barvicí metoda Azan

### Játra – portobiliární prostor metodou Azan

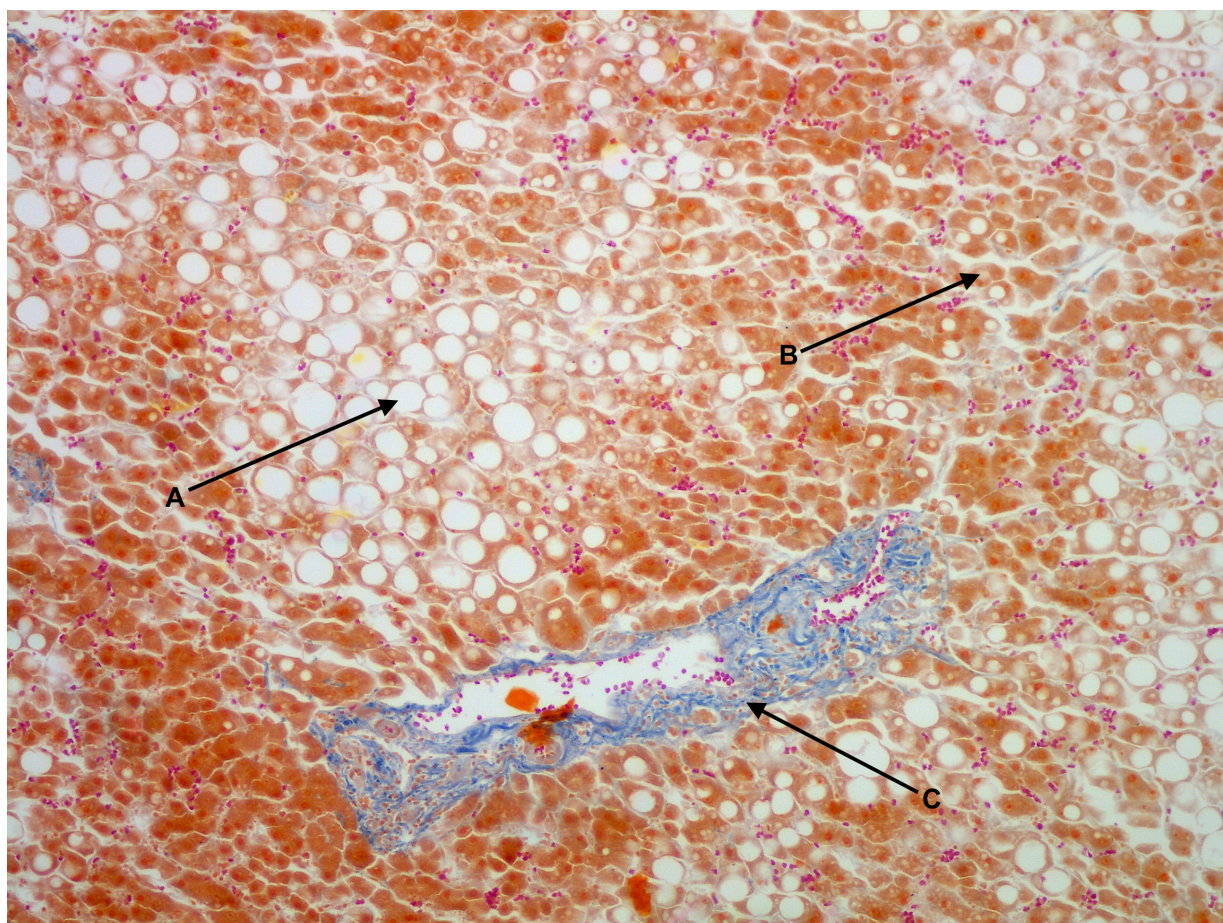


Obrázek 22 : Portobiliární prostor barvený metodou Azan. Zvětšení 10x. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Interlobulární žlučovod
- B. Interlobulární arterie
- C. Interlobulární vena
- D. Vena centralis

- Barvicí metoda Azan barví jádra do červena a kolagen do modré barvy. Zde můžeme pozorovat sytě barevné trámce hepatocytů s modře obarveným portobiliárním prostorem.

## Steatóza – portobiliární prostor, kapénky

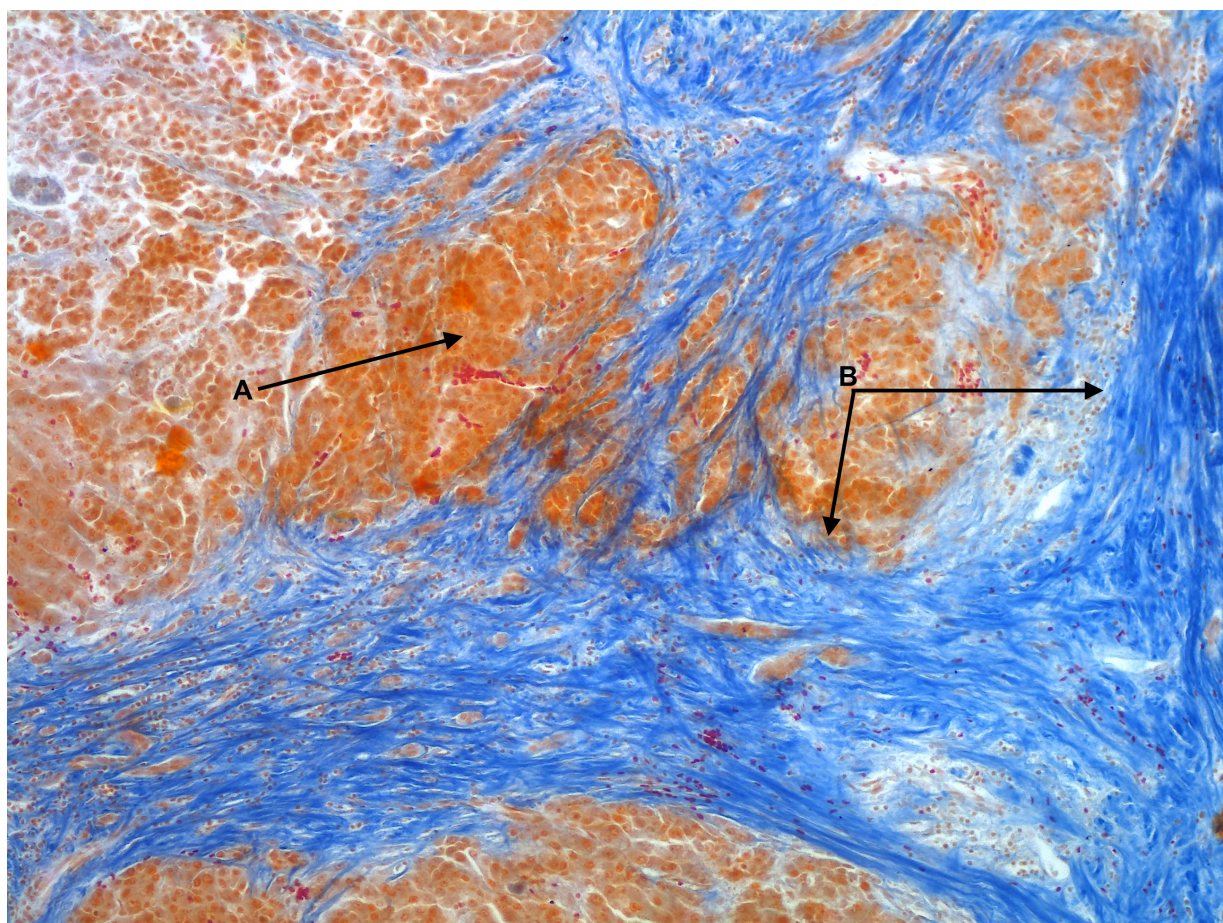


Obrázek 23 : Steatóza – velký obsah tukových kapének, portobiliární prostor. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda Azan . (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Kapénky lipidů
- B. Trámce hepatocytů
- C. Portobiliární prostor

- Viditelné nepravidelné trámce hepatocytů zbývající mezi velkým množstvím tukových vakuol, které ve velké míře difundují. Můžeme zde sledovat zbylé erythrocyty, které se jeví jako růžovočervené elementy.

## Postižená játra – cirhóza, vazivo



Obrázek 24 : Játra postižené cirhózou, hepatocyty jsou nahrazeny vazivem. Zvětšeno 10x. Metoda Azan. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

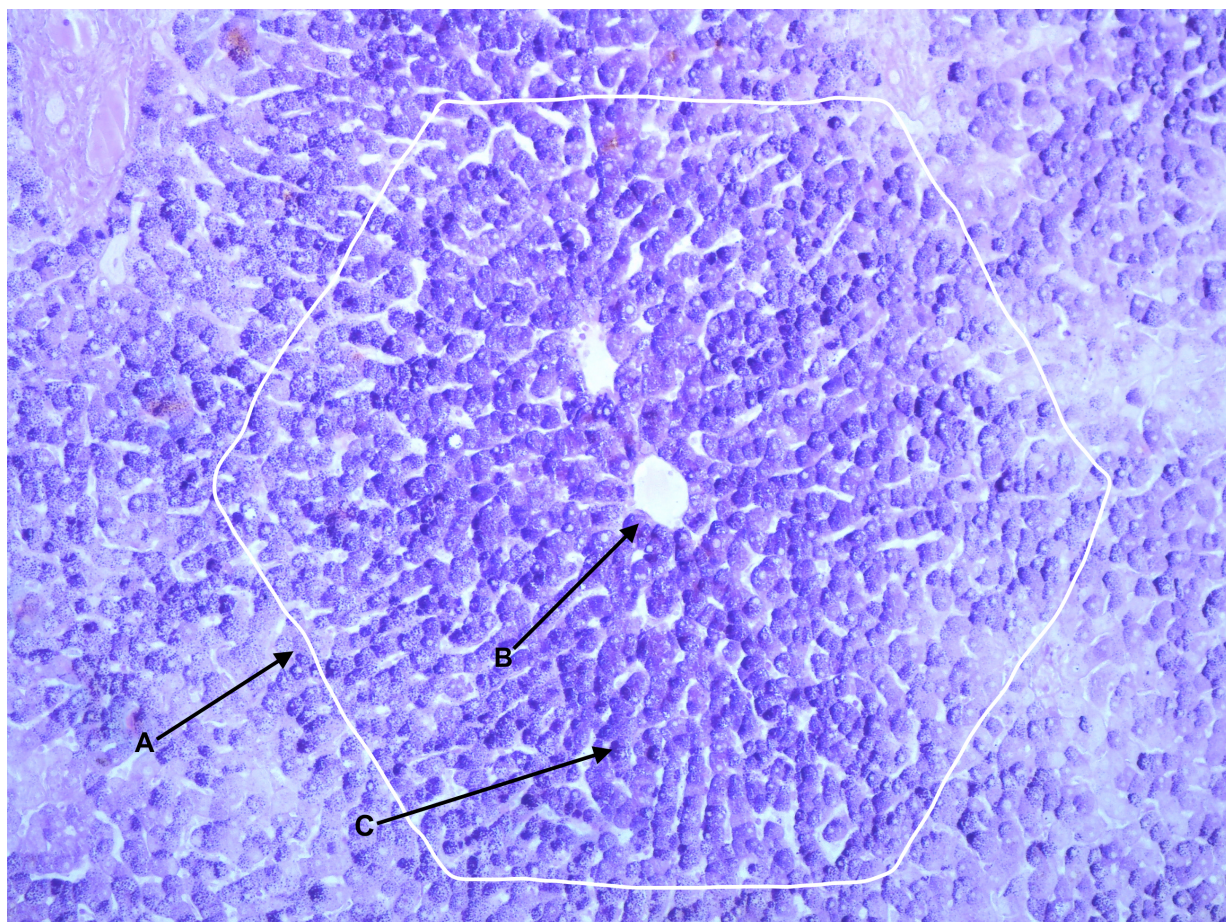
- A. Zbylé trámce hepatocytů
- B. Vazivo

- Rozsáhlé stadium cirhózy. Vazivová septa nevratně nahrazující trámce hepatocytů. Portobiliární prostory zcela zanikají.



## 5.3 PAS reakce – průkaz glykogenu

### Lalůček centrální vény

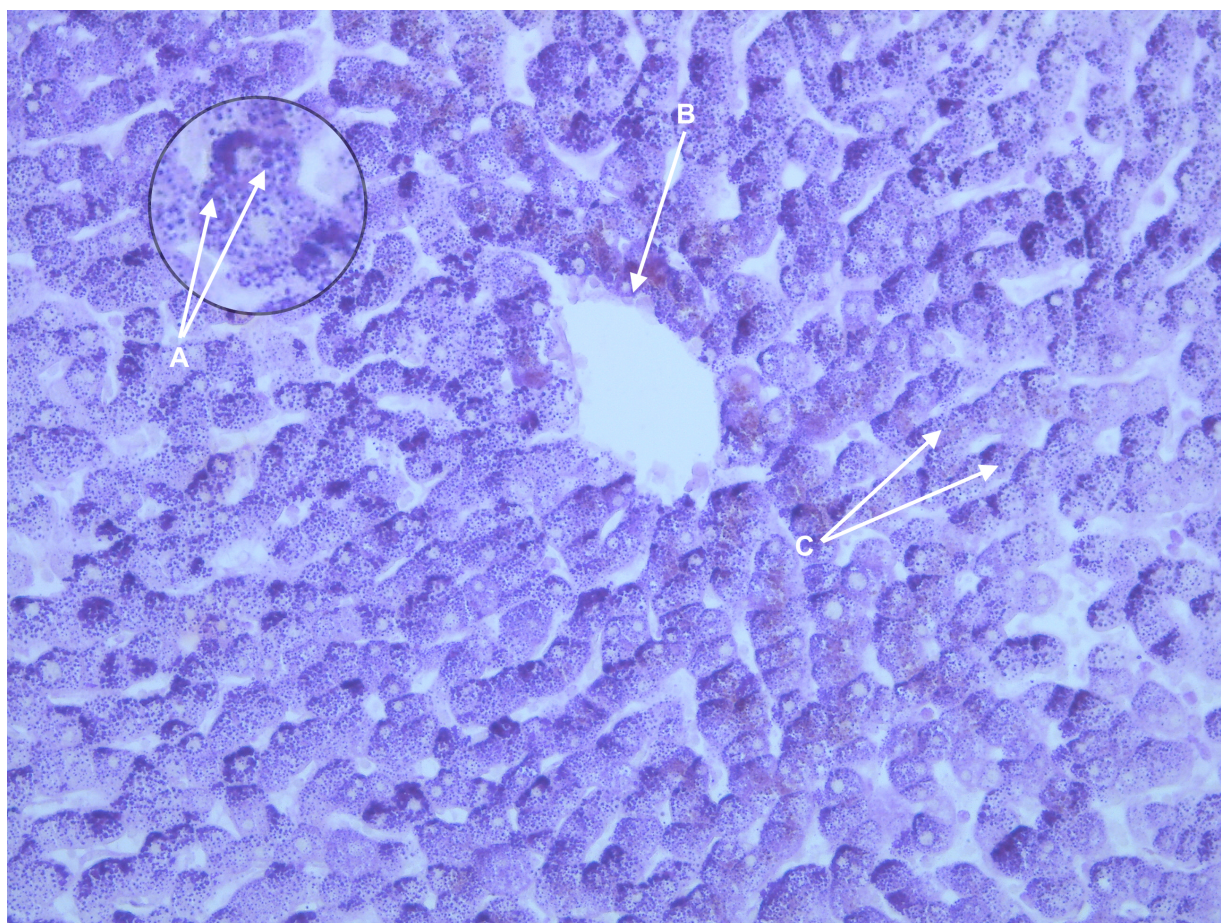


Obrázek 25 : Lalůček centrální vény s průkazem glykogenu. Zvětšení 10x. Metoda PAS reakce. . (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Lalůček centrální vény
- B. Centrální véna
- C. Trámce hepatocytů

- Průkaz glykogenu PAS reakcí. Prokázaný glykogen se nachází především ve středu jaterního lalůčku a v oblasti jaterního acinu. Granula glykogenu pozorujeme jako tmavší části trámců hepatocytů, kde se tento zásobní polysacharid nachází.

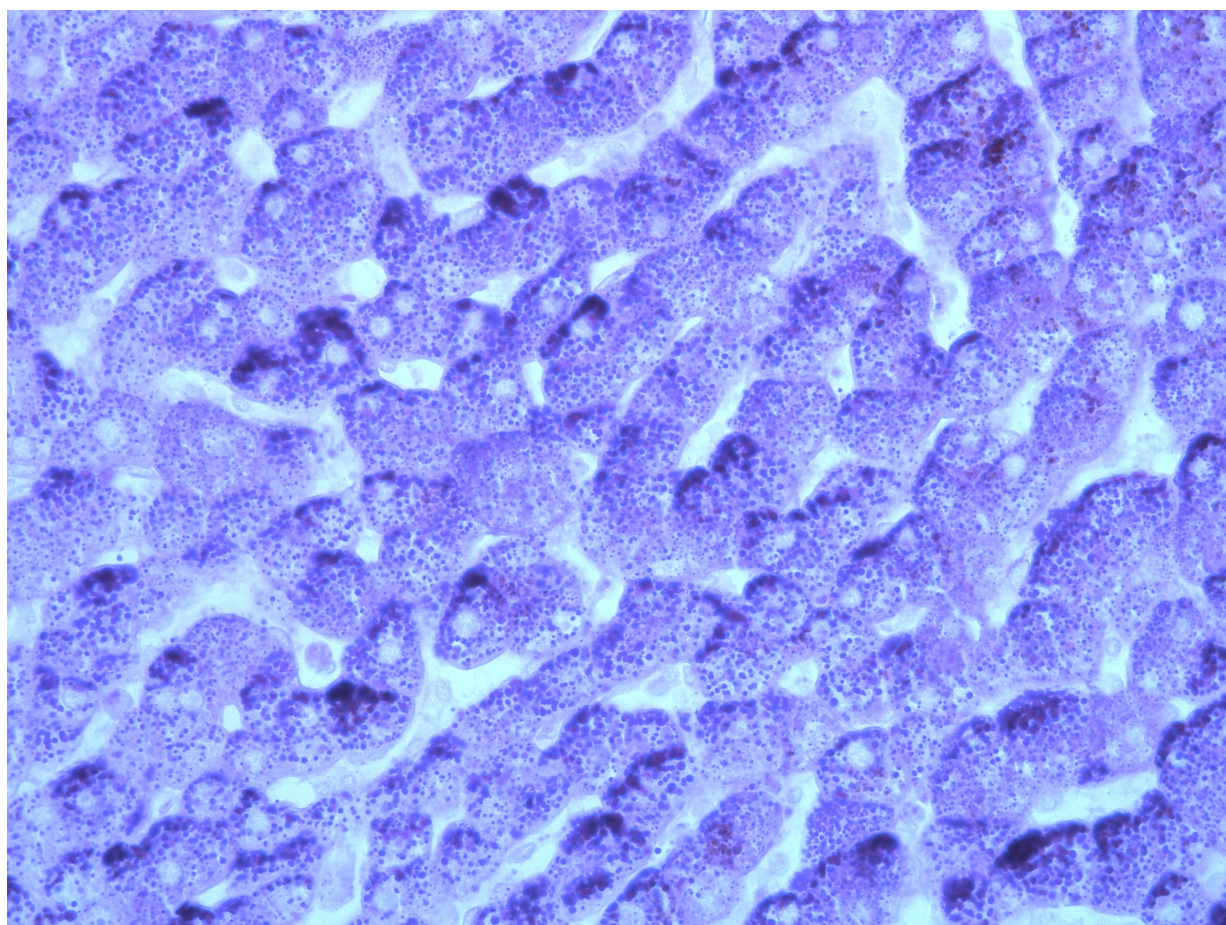
## Vena centralis s průkazem glykogenu



Obrázek 26 : Vena centralis, trámce hepatocytů s prokázaným glykogenem. Zvětšeno 20x. Reakce PAS. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Granula glykogenu
- B. Vena centralis
- C. Trámce hepatocytů

## Trámce hepatocytů, glykogen

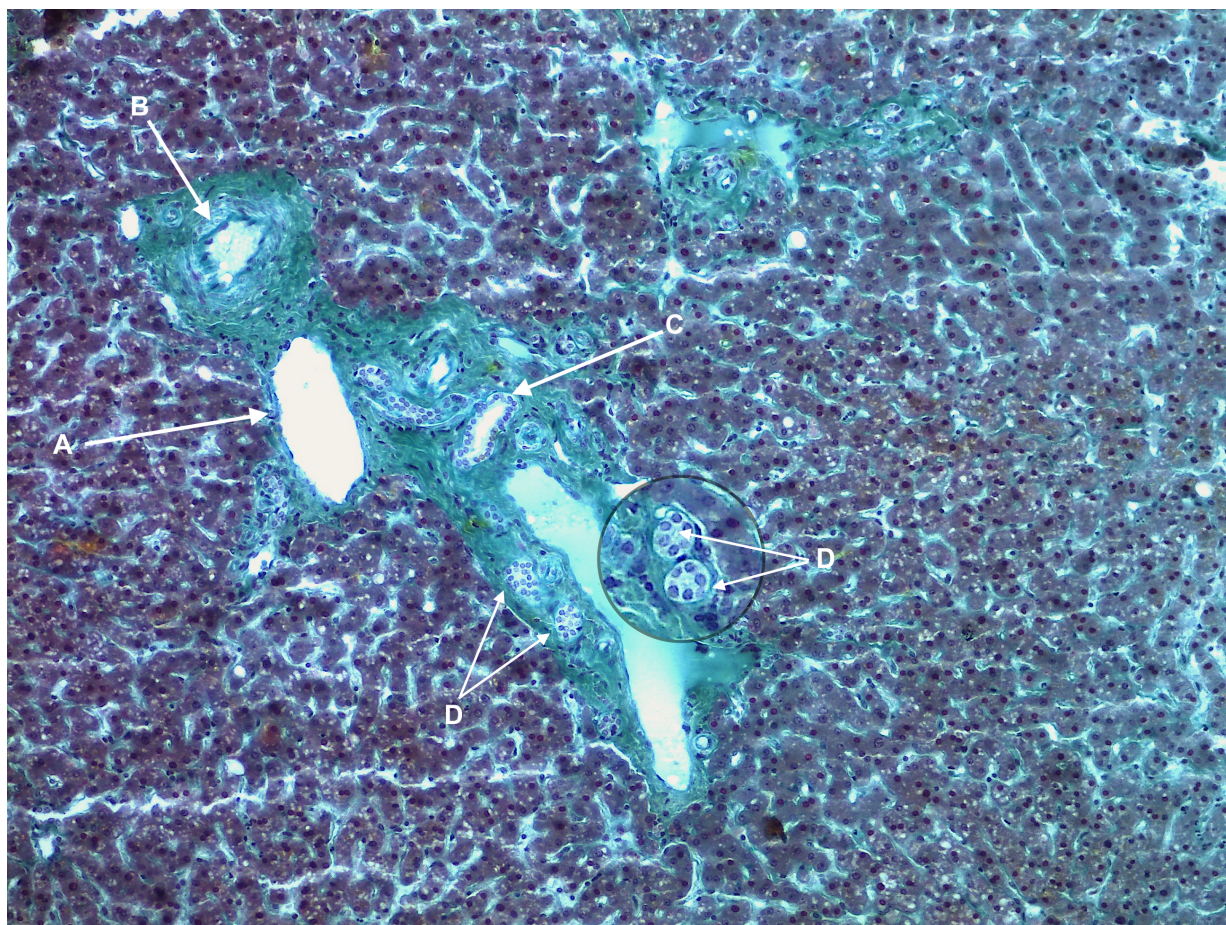


Obrázek 27 : Viditelné granula glykogenu mezi trámci hepatocytů. Zvětšeno 40x. Reakce PAS. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- Detailně znázorněna granula glykogenu mezi trámci hepatocytů. Bílé elementy, které můžeme pozorovat mezi trámci hepatocytů se nazývají Kupfferovy buňky, které jsou součástí stěny jaterních sinusoid.

## 5.4 Barvicí metoda zelený trichrom

### Játra – portobiliární prostor, Heringovy kanálky

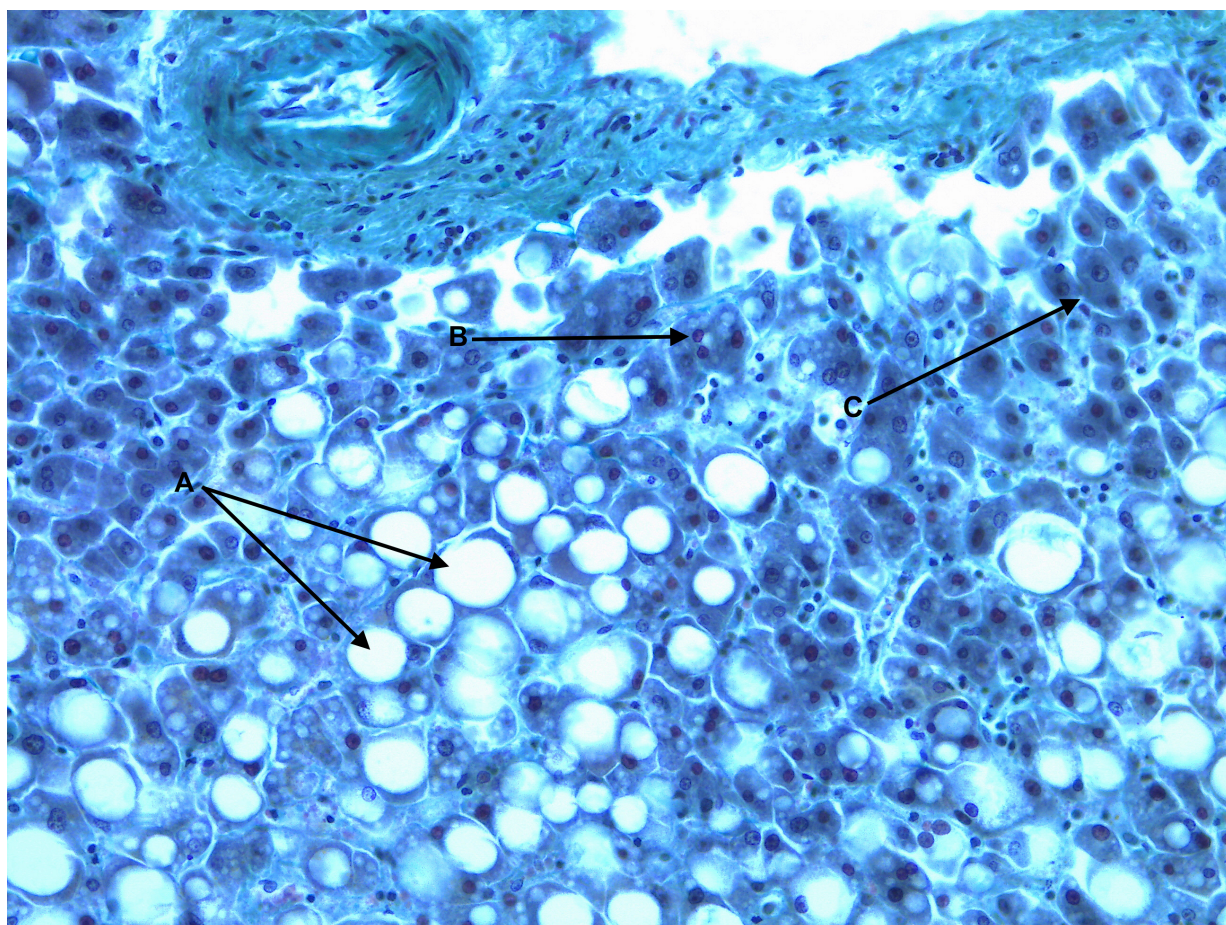


Obrázek 28 : Zeleně zbarvený portobiliární prostor s Heringovými kanálky. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Interlobulární vena
- B. Interlobulární arterie
- C. Interlobulární žlučovod
- D. Heringovy kanálky

- Ojedinělost této fotografie je zachycení Heringových kanálků, spojující žlučové kapiláry a interlobulární žlučovody. Výstelkou těchto kanálků je jednovrstevný kubický epitel, stejně jako u interlobulárních žlučovodů.

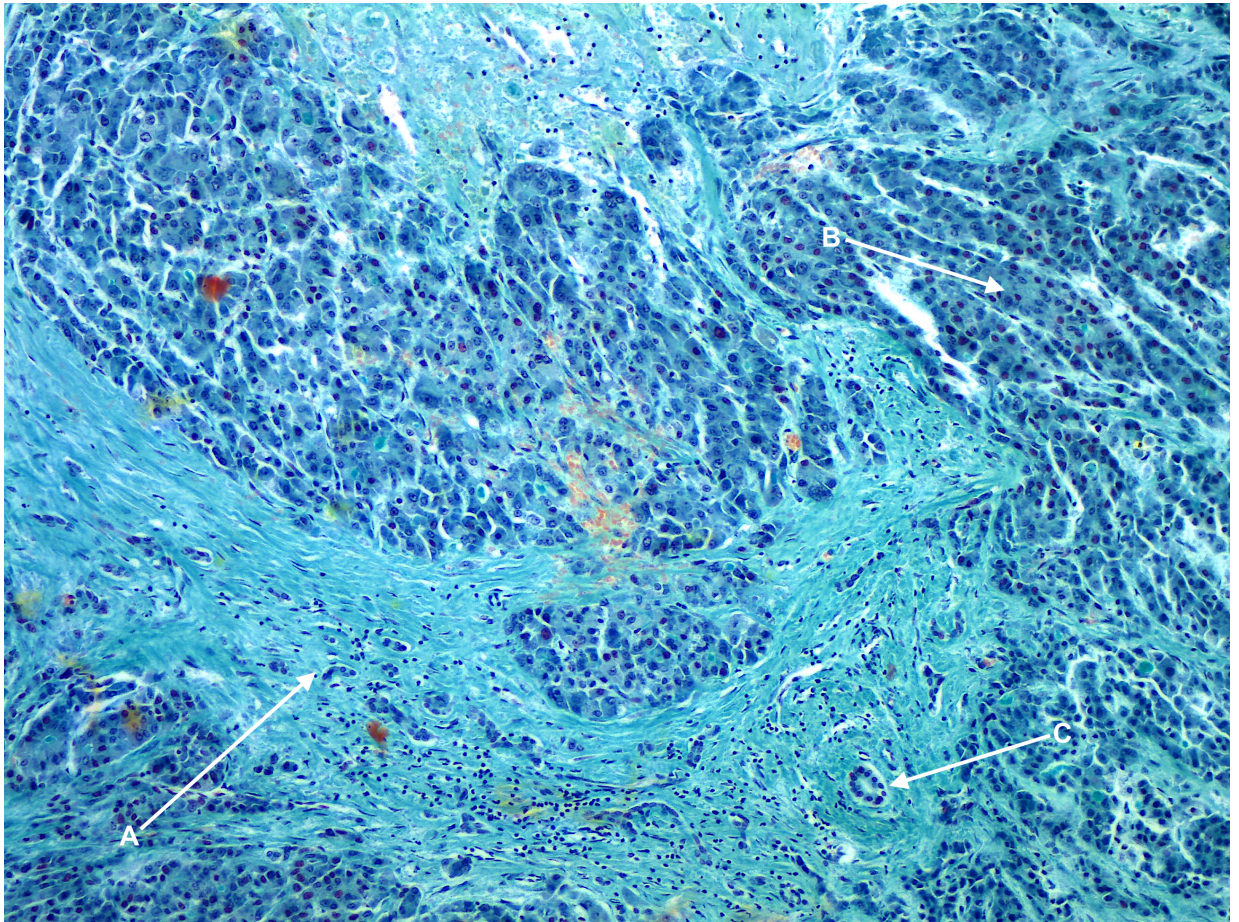
## Steatóza – kapénky lipidů



Obrázek 29 : Kapénky lipidů typické pro steatózu jater. Zvětšeno 20x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Kapénky lipidů
- B. Jádra hepatocytů
- C. Hepatocyty

## Cirhotická játra



Obrázek 30 : Játra postižené cirhózou. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).

- A. Vazivo
- B. Hepatocyty
- C. Interlobulární žlučovod

- Ve světle zeleně obarveném vazivu se v některých případech vyskytují zmnožené žlučové kanálky. V tomto případě byl nalezen pouze jeden interlobulární žlučovod.

## 6 DISKUZE

Příprava histologického preparátu je pro zdravotnictví velice důležitá, a to z hlediska stanovení pozitivní či negativní diagnózy. Každý orgán má svoji specifickou strukturu a její morfologická změna může signalizovat patogenezi. Každá histologická laboratoř má stejný cíl, a to kvalitní zhotovení preparátu z odebrané tkáně. Rozdílem laboratoří je jejich vybavení a tím i postup zhotovení. Příprava preparátů patří mezi manuální práce. S moderní technikou, která dnes přibývá, přicházejí i laboratorní přístroje a jejich úkolem je manuální práci usnadnit. Ne však všechny nemocnice mají tu možnost laboratoře takto vybavit a setkáváme se i s postupem, který je závislý na zručnosti laborantky.

Úkolem bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s histologickou stavbou jaterního parenchymu a průkazem jeho změn, které nastaly vlivem alkoholu. Pro hodnocení tkáně byla zvolena histologická technika a několik základních barvicích metod, které napomohly k dokonalému znázornění všech buněk jater.

Jako první byla zvolena základní a nejvíce používaná metoda hematoxylin-eosin. Tato metoda patří k základním metodám, které využívají všechny klinické laboratoře k běžnému vyšetření tkáně. Kombinace bazického hematoxylinu a kyselého eosinu dodává tkáni kontrast k rozeznání jednotlivých struktur. Metoda H-E je charakteristická svým růžovo-fialovým zbarvením, přesněji cytoplazma buněk a mezibuněčná hmota dostává růžové zbarvení v několika odstínech zásluhou kyselého eosinu. Hematoxylin barví jádra v tmavě modrých odstínech.

Na preparátech s nepoškozenou stavbou jater byla sledována struktura typická pro jaterní parenchym. Podařilo se zachytit lalůček centrální vény (obrázek 18) ve tvaru pravidelného šestiúhelníku obklopeného interlobulárními cévami, přivádějícími krev stékající skrze sinusoidy do vena centralis ve svém středu. Sinusoidy rozlišujeme vzhledem k jejich světlému zbarvení, pouze trámce s hepatocyty obsahují modrofialová jádra.

Na periferii centrálních lalůček jsou tzv. portobiliární prostory (obrázek 19), které obsahují interlobulární venu, arterii a žlučovod. Ve stěně arterie, která přivádí do jater okysličenou krev, pozorujeme typicky uspořádané hladké svalové buňky v tunica media. Jednovrstevný kubický epitel je charakteristickou výstelkou interlobulárního žlučovodu. Cihlově červené elementy nacházející se v sinusoidech, interlobulárních arteriích a vénách

jsou zbylé erythrocyty dokazující průtok krve. Portobiliární prostory jsou vyplněny malou vrstvičkou vaziva, za kterou jsou uloženy trámce hepatocytů s krevními sinusoidy.

Na obrázku 20, 21 můžeme na první pohled pozorovat histologické změny ve struktuře jater postižených steatózou. V cytoplazmě hepatocytů se hromadí velká tuková vakuola, vzhledem k jejich velikosti se jedná o velkokapénkovou steatózu. To nám potvrzuje obrázek 21, kdy jedna velká vakuola tuku v hepatocytu utlačuje jádro na periferii buňky. Tukové kapénky se nám jeví jako prázdné prostory, a to z důvodu použití alkoholové řady při odvodnění tkáně, během které se tuky extrahují.

Další zvolená barvicí metoda Azan barví jádra do červena, kolagen do odstínů modré a svaly s ostatními typy granul do oranžova. Tato metoda byla ideální pro barvení cirhotických jater, kde pozdvihla modrým zbarvením rozsáhlé vazivové septa (obrázek 24). Můžeme zde také pozorovat trámce, které mají nepravidelný průběh a jejich uspořádání směrem k vena centralis chybí. Portobiliární prostor a vena centralis se v uzlech zcela ztrácí.

Glukóza je v játrech ukládána ve formě glykogenu, a to především v hepatocytech, které jsou uprostřed lalůčku a ve 3. zóně portálního acinu. Buňky obsahující granula glykogenu můžeme pozorovat tmavší, v okolí portobiliárních prostor jsou znatelně světlejší buňky, glykogen se zde vyskytuje v malé míře nebo vůbec (obrázek 25). Průkazem glykogenu jsme dosáhli pomocí PAS reakce, která využívá vzniku volných aldehydových skupin při oxidaci kyselinou jodistou. Aldehydy následně reagují se Schiffovým činidlem za vzniku fialového zbarvení v místě uloženého glykogenu.

Na jednom z preparátů zdravých jater se podařilo zachytit Heringovy kanálky spojující žlučové kapiláry a intralobulární žlučovody. Můžeme zde pozorovat jednovrstevný kubický epitel, kterým jsou vystlány (obrázek 28). Barvicí metoda zelený trichrom zbarvila tkáň do odstínu zelené. Cytoplazma buněk je zbarvena červenozeleně, jádra tmavě zeleně až černě a portobiliární prostor světle zeleně až tyrkysově.

Pro zdokumentování tkání byl zvolen mikroskop Leica BMLB s příslušnou kamerou Leica MC 170 HD a programem pro zdokumentování a úpravu fotek LAS V 4,8 Leica application suite.. Jednotlivé tkáně si vyžadovaly různé zvětšení, to bylo uzpůsobeno pro nejlepší studium struktur tkáně. Použity byly tři základní zvětšení, jednalo se o zvětšení 10krát,, 20krát a 40krát.. V klinických laboratořích mají na starost odčítání tkání zkušeni patologové, neboť některé morfologické změny ve struktuře by běžný laik natolik nepoznal.



Při odečítání preparátů tkáně jater této bakalářské práce napomáhal zkušený histolog MUDr. Richard Becke.

Při včasné diagnóze se jaterní parenchym může zachránit. Signálem pro laboratorní vyšetření je několik důvodů a jeden z nich může být právě alkoholismus. Alkoholismus je velmi častým problémem a v mnoha případech má své oběti. V České republice jsou desetitisíce lidí, kteří problematicky konzumují alkohol, a tato problematika se v posledních letech rozšiřuje i mezi nezletilými. I přestože je alkohol legální, patří mezi drogovou problematiku.

Tato bakalářská práce je zaměřena na studii jater a jeho onemocnění vlivem alkoholu, které by nemělo být opomíjeno. Histologické vyšetření a potvrzení změn ve struktuře patří k pozitivní diagnostice a včasnému lékařskému opatření. V některých případech však už není prevence možná. Při rozsáhlém cirhotickém onemocnění jater nejsou jaterní buňky schopné regenerace. V počátečních stádiích nemusí být příznaky viditelné, oproti tomu biochemické vyšetření může signalizovat jaterní testy mimo referenční mez.

Biochemické vyšetření by nemělo být zanedbatelné, postižení jater může signalizovat nebo také potvrdit. Jaterní testy stanovují hodnoty ALT, AST, GGT, ALP a bilirubin. V důsledku poškození cytoplazmatické membrány dochází k uvolnění enzymů lokalizovaných v cytoplazmě, mezi tyto indikátory patří zmíněné ALT a cAST. Při závažném onemocnění, jako je například cirhóza, se hepatocyty rozpadají a do extracelulárního prostoru nepronikají jen cytoplazmatické enzymy, ale také enzymy lokalizované v mitochondriích (mAST).

## 7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s anatomicou a histologickou strukturou jaterního parenchymu a jeho změnám vlivem alkoholu, přesněji onemocnění cirhózy a steatózy. Pro studium jaterní tkáně byla zvolena histologická technika, neboť umožňuje zobrazení těchto detailních struktur a buněk.

Cílem praktické části bylo zhotovení vlastních histologických preparátů a studium jejich mikroskopických obrazů, na kterých byly objasněny struktury popsané v teoretické části. Bylo vybráno několik barvicích metod, které umožnily studium tkáně v několika obrazech, a průkaz glykogenu nacházející se v hepatocytech. Následně byly zhotovené preparáty mikroskopicky zdokumentovány.

Všechny cíle určené v této bakalářské práci se podařilo splnit. Zhotovení histologických preparátů dovedlo autora práce k důkladnému seznámení a zpracování histologického materiálu manuální prací, která je dnes v klinických laboratořích nahrazována přístrojovou technikou. Osobně zhotovené preparáty mohou sloužit a rozvíjet studium tkáně jater a upozornit na problematiku alkoholismu úzce spojenou s patologií jater.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

%	procenta
°C	stupeň Celsia (jednotka teploty)
1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
ALP	alkalické fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
cm	centimetr [ $10^{-3}$ m] (jednotka délky)
CNS	centrální nervová soustava
Ctrl 1	Chymotrypsin-like protease Protein
g	gram (jednotka hmotnosti)
GGT	gammaglutamyltransferyláza
GLUT2	glucose transporter 2
h	hodina [3 600 s] (jednotka času)
HLA	Human Leucocyte Antigen
IL	interleukin
kg	kilogram (jednotka hmotnosti)
l	litr (jednotka objemu)
LPS	Lipopolysaccharides
ml	mililitr [ $10^{-3}$ l] (jednotka objemu)
NK	natural killers
NTCP	Na-taurocholate cotransporting polypeptide
PAS	Periodic Acid Schiff
RBS	retinol-binding protein
s	sekunda (jednotka času)
TNF	Tumor Necrosis Factor
VLDL	very low-density lipoprotein
μm	mikrometr [ $10^{-6}$ m] (jednotka délky)

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003, 772 s. ISBN 8024705125.
- [2] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 2*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2013, 512 s. ISBN 978-80-247-4788-0.
- [3] EHRMANN, Jiří a Petr HŮLEK. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2010, 658 s. ISBN 978-80-247-3118-6.
- [4] BOROEVANSKÝ, Ladislav. *Soustavná anatomie člověka*. 5. vyd. Praha: Avicenum, 1976.
- [5] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [6] MERKUNOVÁ, Alena a Miroslav OREL. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada, 2008. Psyche (Grada). ISBN 978-80-247-1521-6.
- [7] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H, 1997. ISBN 80-857-8737-7.
- [8] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [9] KLIKA, Eduard. *Histologie*. Praha: Avicenum, 1986.
- [10] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H, 2000. ISBN 80-860-2280-3.
- [11] HORKÝ, Drahomír a Svatopluk ČECH. *Mikroskopická anatomie*. 3., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5550-6.
- [12] ŠPIČÁK, Julius. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. Praha: Grada, 2008, 424 s. ISBN 978-80-247-1783-8.
- [13] ROKYTA, Richard. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Praha: ISV, 2000. Lékařství. ISBN 80-858-6645-5.
- [14] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [15] ŠVÍGLEROVÁ, Jitka a Jana SLAVÍKOVÁ. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1526-4.
- [16] *Kupffer cell* [online]. In: . [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep15685/figures/6>. ISSN 2045-2322.

- [17] Kupfferovy a Itovy buňky. *Wikipedia* [online]. [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kupfferova\\_buňka](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kupfferova_buňka)
- [18] LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012. ISBN 978-80-7080-806-1.
- [19] ZIMA, Tomáš. Etanol – toxicita a mechanismus účinku. *Revue České lékařské akademie*. 2013, **9**(9.), str. 11-13. ISSN 1214-8881.
- [20] KANEL, Gary C. a Jacob. KORULA. *Atlas of liver pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2005. ISBN 9780721600192.
- [21] EHRMANN, Jiří a Petr SCHNEIDERKA. *Alkohol a játra*. Praha: Grada, 2006. Malá monografie (Grada). ISBN 802471048X.
- [22] SHERLOCK, Sheila a James DOOLEY. *Nemoci jater a žlučových cest*. Překlad 11. vydání. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2004. ISBN 8086703002.
- [23] MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024735306.
- [24] [EDITED BY] THOMAS D. BOYER, MICHAEL P. MANNS a ARUN J. SANYAL. *Zakim and Boyer's hepatology: a textbook of liver disease*. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2012. ISBN 9781437708813.
- [25] CSÉMY, PhDr. Ladislav a PhDr. Petr WINKLER. Alkohol v České republice: spotřeba, zdravotní škody a ekonomické ztráty společnosti. *Revue České lékařské akademie*. 2013, **9**(9.), str. 8-9. ISSN 1214-8881.
- [26] JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén, c2006. Základy (Galén). ISBN 8072622633.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 : Lalůček centrální žíly. Upraveno [2].....	11
Obrázek 2 : Mikroskopické znázornění jater : Portobiliární prostor. (Tereza Hrubcová, 2017).....	13
Obrázek 3 : Členění jaterního parenchymu. (Tereza Hrubcová, 2017). ....	16
Obrázek 4 : Jaterní lalůček. (Tereza Hrubcová, 2017). ....	17
Obrázek 5 : Sekrece a transport žluči v období jídla: CCK kontrahuje žlučník a relaxuje Oddiho svěrač [14].....	23
Obrázek 6 : Znázornění Kupfferových buněk. Upraveno. [16].....	28
Obrázek 7 : Změna postižených jater. Upraveno. [24]. ....	35
Obrázek 8 : Vývoj spotřeby alkoholu na obyvatele v přepočtu na 100% alkohol dle údajů Českého statistického úřadu [25].....	36
Obrázek 9 : Deparafinace (Tereza Hrubcová, 2017), zleva : Xylen I, Xylen II, 100% ethanol, 96% ethanol.....	40
Obrázek 10 : Eosin, oplach vodou (Tereza Hrubcová, 2017).....	42
Obrázek 11 : Hematoxylin - eosin (Tereza Hrubcová, 2017). Zleva : hematoxylin, kyselý alkohol, 2% NaHCO <sub>3</sub> , eosin, destilovaná voda.....	42
Obrázek 12 : PAS reakce (Tereza Hrubcová, 2017). Shora : Deparafinace, PAS reakce, odvodnění, projasnění.....	44
Obrázek 13 : Zeleň světlá, oplach vodou. (Tereza Hrubcová, 2017).....	45
Obrázek 14 : Zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017).....	46
Obrázek 15 : Barvení Azan. (Tereza Hrubcová, 2017).....	47
Obrázek 16 : Řezy obarvené azokarmínem v destilované vodě. (Tereza Hrubcová, 2017). ....	48
Obrázek 17 : Odvodnění a projasnění. (Tereza Hrubcová, 2017). ....	49
Obrázek 18 : Lalůček centrální vény zdravých jater. Zvětšeno 10x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). ....	50
Obrázek 19 : Portobiliární prostor. Zvětšeno 40x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).....	51
Obrázek 20 : Játra postižená steatózou. Zvětšení 10x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).....	52
Obrázek 21 : Velkokapénková steatóza. Zvětšeno 20x. Metoda hematoxylin-eosin. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).....	53

Obrázek 22 : Portobiliární prostor barvený metodou Azan. Zvětšení 10x. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).....	54
Obrázek 23 : Steatóza – velký obsah tukových kapének, portobiliární prostor. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda Azan . (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	55
Obrázek 24 : Játra postižené cirhózou, hepatocyty jsou nahrazeny vazivem. Zvětšeno 10x. Metoda Azan. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	56
Obrázek 25 : Lalůček centrální vény s průkazem glykogenu. Zvětšení 10x. Metoda PAS reakce. . (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	57
Obrázek 26 : Vena centralis, trámce hepatocytů s prokázaným glykogenem. Zvětšeno 20x. Reakce PAS. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	58
Obrázek 27 : Viditelné granula glykogenu mezi trámci hepatocytů. Zvětšeno 40x. Reakce PAS. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	59
Obrázek 28 : Zeleně zbarvený portobiliární prostor s Heringovými kanálky. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	60
Obrázek 29 : Kapénky lipidů typické pro steatózu jater. Zvětšeno 20x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie).....	61
Obrázek 30 : Játra postižené cirhózou. Zvětšeno 10x. Barvicí metoda zelený trichrom. (Tereza Hrubcová, 2017, vlastní fotografie). .....	62