

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Význam overexprese endoglinu v procesu jaterního zánětu při
indukci steatohepatitidy asociované s metabolickou dysfunkcí
(MASH)

The importance of endoglin overexpression in the liver
inflammation process during the induction of metabolic
dysfunction-associated steatohepatitis (MASH)

Jana Nývltová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2025

Poděkování

Velice děkuji prof. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, také za čas a informace poskytnuté během vypracovávání mé diplomové práce. Zároveň chci poděkovat kolegyni Niloufar Mohammadi za odborné rady a za pomoc s experimentální částí mé diplomové práce, která probíhala v laboratoři.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2025

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Játro.....	10
3.1.1 Anatomie a histologie.....	10
3.1.2 Jaterní oběh krve a žluče	12
3.1.3 Funkce.....	13
3.2 Onemocnění jater	15
3.2.1 Ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí (MAFLD)	15
3.2.2 Steatohepatitida spojená s metabolickou dysfunkcí (MASH)	17
3.2.3 Význam zánětu v patogenezi MASH.....	20
3.2.4 Dysfunkce jaterních sinusoid	21
3.2.5 Adhezní molekuly	22
3.2.6 Význam Mac-2 v imunitním systému	24
3.3 Experimentální modely MASH/NASH	25
3.3.1 Dieta s nedostatkem methioninu a cholinu (MCD)	25
3.3.2 Dieta s deficitem L-aminokyseliny a nedostatkem cholinu (CDAA).....	26
3.3.3 Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD).....	26
3.4 Endoglin	27
3.4.1 Struktura	27
3.4.2 Proces signalizace	29
3.4.3 Fyziologická a patologická role endoglinu	31
3.5 Význam endoglinu v jaterní patologii	33
3.5.1 Endoglin a MAFLD/MASH	33
3.6 Princip western blot analýzy	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 Metodika	37

4.2	Chemikálie.....	37
4.3	Pokusná zvířata – experimentální model.....	37
4.4	Western blot analýza	38
4.4.1	Příprava vzorku	38
4.4.2	Elektroforéza	39
4.4.3	Přenos na membránu	39
4.4.4	Blokování	40
4.4.5	Inkubace protilátek.....	41
4.4.6	Detekce	41
4.5	Statistická analýza dat.....	42
5.	VÝSLEDKY	43
5.1	Ověření experimentálního modelu.....	43
5.1.1	Aktivita AST v plazmě.....	43
5.1.2	Poměr hmotnosti jater vůči tělesné hmotnosti myších modelů	44
5.1.3	Váha pokusných zvířat	45
5.1.4	Expresce lidského endoglinu	46
5.2	Expresce proteinů zaměřených na zánět.....	47
5.2.1	Expresce ICAM-1	47
5.2.2	Expresce VCAM-1	48
5.2.3	Expresce Mac-2	49
6.	DISKUSE	50
7.	ZÁVĚR.....	52
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	53
9.	SEZNAM TABULEK.....	56
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	57
11.	SEZNAM GRAFŮ	58
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	59

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Význam overexprese endoglinu v procesu jaterního zánětu při indukci steatohepatitidy asociované s metabolickou dysfunkcí (MASH).

Autor: Jana Nývltová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv overexprese lidského endoglinu u transgenního myšího modelu na změny exprese proteinů VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 v průběhu onemocnění MASH.

Metody: K provedení experimentu byly využity zvířecí modely rozdělené do tří skupin. První skupina byla zvířata se zdravými játry. Druhou skupinu tvořily modely krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD za účelem vyvolání stavu obdobného onemocnění jater MASH. Třetí skupinu zahrnovaly modely rovněž krmené dietou CDAA-HFD, navíc byly geneticky upravené tak, aby byly schopné produkovat lidský endoglin (předchozí skupiny tuto schopnost nemají). Pro určení exprese endoglinu a sledovaných proteinů byla použita metoda western blot analýza. Pro statistické vyhodnocení dat byl použit neparametrický Mann-Whitney test.

Výsledky: Podávání diety CDAA-HFD vedlo k navození MASH což bylo potvrzeno zvýšením aktivity AST a signifikantním zvýšením exprese VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 v játrech ve srovnání s kontrolní skupinou, které byla podávána standardní dieta. Přítomnost overexprese lidského endoglinu nevedla k signifikantnímu ovlivnění exprese adhezních molekul, Mac-2 a aktivity AST.

Závěr: Podávání experimentální diety vedlo k navození patologického stavu MASH, ale přítomnost overexprese lidského endoglinu proces MASH neovlivnila.

Klíčová slova: Eng, TGF- β , MAFLD, MASH, VCAM-1, ICAM-1, Mac-2, Western blot, Mann-Whitney test

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of thesis: The importance of endoglin overexpression in the liver inflammation process during the induction of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH).

Author: Jana Nývltová

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: The aim of the thesis was to determinate the effect of human endoglin overexpression on the VCAM-1, ICAM-1 and Mac-2 expression during the development of MASH disease.

Methods: The experiment used animal models divided into three groups. The first group was animals with healthy livers. The second group consisted of models fed a combined CDAA-HFD diet to induce a condition similar to MASH liver disease. The third group included models also fed a CDAA-HFD diet, in addition, they were genetically modified to be able to produce human endoglin (the previous groups do not have this ability). Western blot analysis was used to determine the expression of endoglin and monitored proteins. The non-parametric Mann-Whitney test was used for statistical analysis of the data.

Results: Administration of the CDAA-HFD diet led to induction of MASH, which was confirmed by an increase in AST activity and a significant increase in the expression of ICAM-1, VCAM-1, and Mac-2 in the liver compared to the control group receiving the standard diet. The presence of overexpression of human endoglin did not lead to a significant effect on the expression of adhesion molecules, Mac-2 and AST activity.

Conclusion: Administration of the experimental diet led to the induction of the pathological MASH state, but the presence of overexpression of human endoglin did not affect the MASH process.

Key words: Eng, TGF- β , MAFLD, MASH, VCAM-1, ICAM-1, Mac-2, Western blot, Mann-Whitney test

1. ÚVOD

Patologickým stavem rozumíme řadu změn u mechanických, fyzických a biochemických funkcí v organismu. Tato práce se zabývá jaterními onemocněními spojenými s metabolickými změnami a narušením metabolismu lipidů. Pro správné stanovení diagnózy se provádí různá vyšetření. Vedle fyziologického vyšetření, kdy sledujeme navenek pozorovatelné změny, je důležité rovněž laboratorní vyšetření, při kterém sledujeme koncentraci různých látek - biomarkerů v pozorovaném vzorku. Vedle endoglinu jsou v této práci sledovanými biomarkery VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 (Galectin-3).

Endoglin je transmembránový glykoprotein s povrchovou aktivitou CD105. Reguluje proliferaci a migraci endotelových buněk, hraje klíčovou roli ve vývoji angiogeneze. Míra jeho exprese se odvíjí od zdravotního stavu pacienta. V případě patologického stavu, například při onemocnění jater či kardiovaskulárního systému nebo při nádorovém onemocnění, jeho exprese stoupá. Endoglin je pro svou vysokou selektivitu důležitým a spolehlivým biomarkerem. Spolu s dalšími biomarkery může být využit k diagnostice a screeningu řady onemocnění.

Biomarkery VCAM-1 a ICAM-1 charakterizujeme jako proteiny adhezního charakteru, které mají regulační roli v procesech imunity, podílejí se na zánětlivých reakcích a účastní se rozvoje různých onemocnění. Jejich exprese, stejně jako u endoglinu, výrazně stoupá během postupujícího zánětlivého onemocnění. Jsou proto také využívány jako další ukazatele v diagnóze. Mac-2 představuje glykoprotein s regulační funkcí v mechanismech imunity, fibrózy a karcinogeneze. Používá se jako marker pro detekci makrofágů ve tkáních.

V experimentální části sledujeme koncentraci uvedených biomarkerů v pozorovaných vzorcích. Jako experimentální model jsou použity vzorky z pokusných zvířat rozdělených do třech skupin (bez onemocnění, se simulovaným onemocněním bez schopnosti exprese lidského endoglinu a se simulovaným onemocněním navíc se schopností exprese lidského endoglinu). Pro určení míry exprese je použita metoda western blot analýza. Součástí experimentální části je i ověření laboratorního modelu. Výsledky jsou statisticky zpracovány pomocí speciálního software, použitou metodou je Mann-Whitney test.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce je zaměřena na jaterní onemocnění MAFLD (Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease – Ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí) a MASH (Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis – Steatohepatitida spojená s metabolickou dysfunkcí).

Vycházíme z toho, že při uvedených onemocněních dochází ke zvýšené produkci endoglinu i biomarkerů VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2. Jejich exprese je podpořena imunitním systémem v rámci zánětlivé odpovědi vyvolané nadměrnou akumulací tuků a porušením metabolických drah.

Hypotézou je, že overexprese endoglinu má významný dopad na expresi uvedených adhezních molekul a infiltraci makrofágů podílejících se na progresi onemocnění MAFLD a MASH.

Cílem diplomové práce bylo sledovat změny exprese biomarkerů VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 v závislosti na overexpresi endoglinu. Pokud by se prokázalo, že exprese endoglinu výrazně podporuje produkci sledovaných proteinů, mohla by tato skutečnost být důležitou informací sloužící k lepšímu poznání mechanismu uvedených onemocnění, případně k dalším postupům léčby těchto onemocnění.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Játtra

Játtra (*hepar*) jsou největším orgánem a zároveň nejtěžší exokrinní žlázou v lidském těle. U dospělého člověka představují 2-3 % celkové tělesné hmotnosti. Jejich váha se pohybuje u mužů v rozmezí 1,4-1,8 kg, u žen v rozmezí 1,2-1,4 kg. Jsou uložena pod bránicí v pravé horní části břicha a kryta žebry. Játtra jako orgán červenohnědé barvy a nepravidelného tvaru má na starosti řadu fyziologických procesů. Řadíme mezi ně produkci žluči, fetální krvetvorbu a metabolické funkce (1) (2).

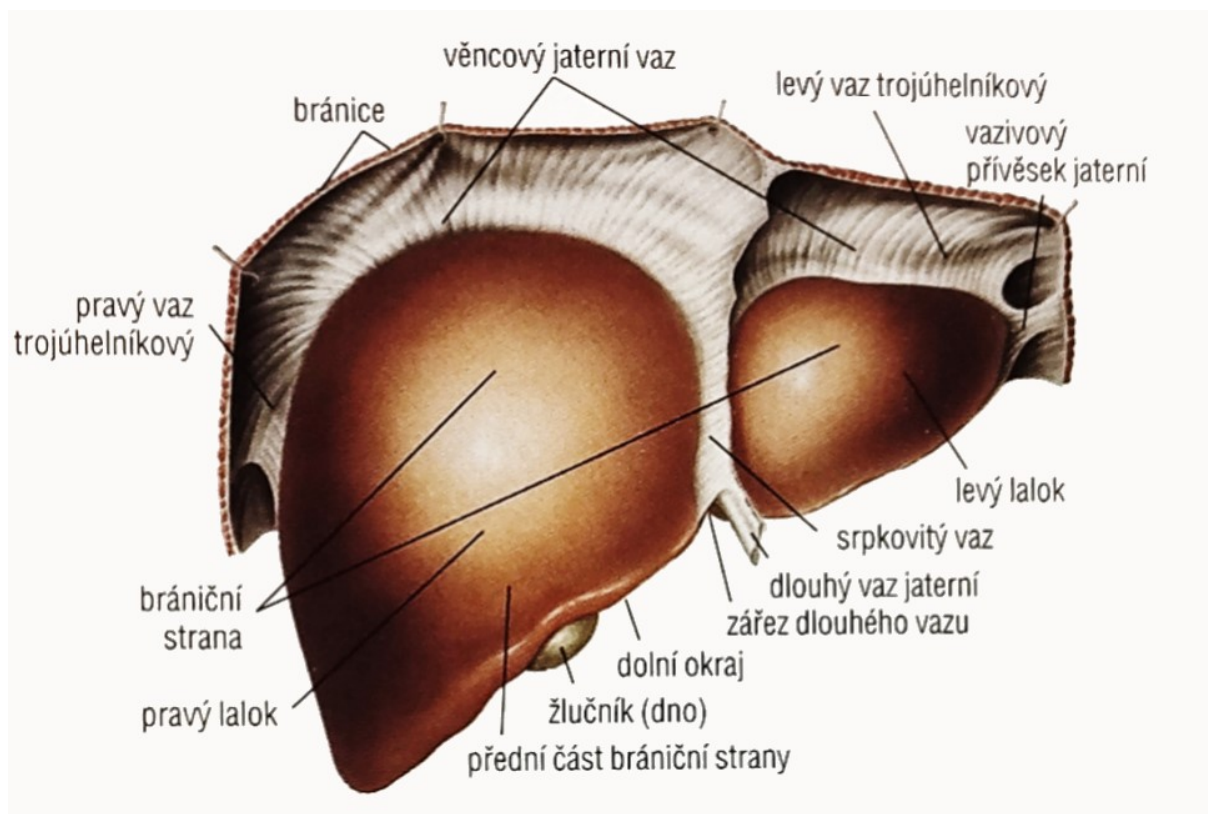
3.1.1 Anatomie a histologie

Játtra jsou pokryta lesklým peritoneálním povlakem (*Tunica serosa*), pod ním se nachází vrstva vaziva (*Tela subserosa*). Hluběji je položen pevný vazivový povlak (*Tunica fibrosa*, též *Capsula Glissoni*) (1). Své umístění si játra udržují pomocí peritoneálních záhybů neboli vazivových úponů (2). Vpředu se nachází *ligamentum falciforme*, vzadu *ligamentum venosum*, na spodní straně je přítomen *ligamentum teres hepatis*. Na spodní straně orgánu je také umístěn žlučník (*vesica fellea*) (3).

Z anatomického hlediska rozdělujeme játra na větší pravý lalok (*lobus dexter*) a menší levý lalok (*lobus sinister*) (3). Mezi nimi se na spodní straně orgánu nachází další dva laloky – *lobus quadratus* umístěný vpředu a *lobus caudatus* umístěný vzadu (1) (3). Jednotlivé laloky jsou od sebe odděleny rýhami. Ty vytváří prostor pro vstup a výstup cév a žlučových cest zvaný *porta hepatis* (1).

Na Obr. 1 je znázorněna anatomie jater.

Obrázek 1. Anatomie jater, převzato a upraveno z (4)



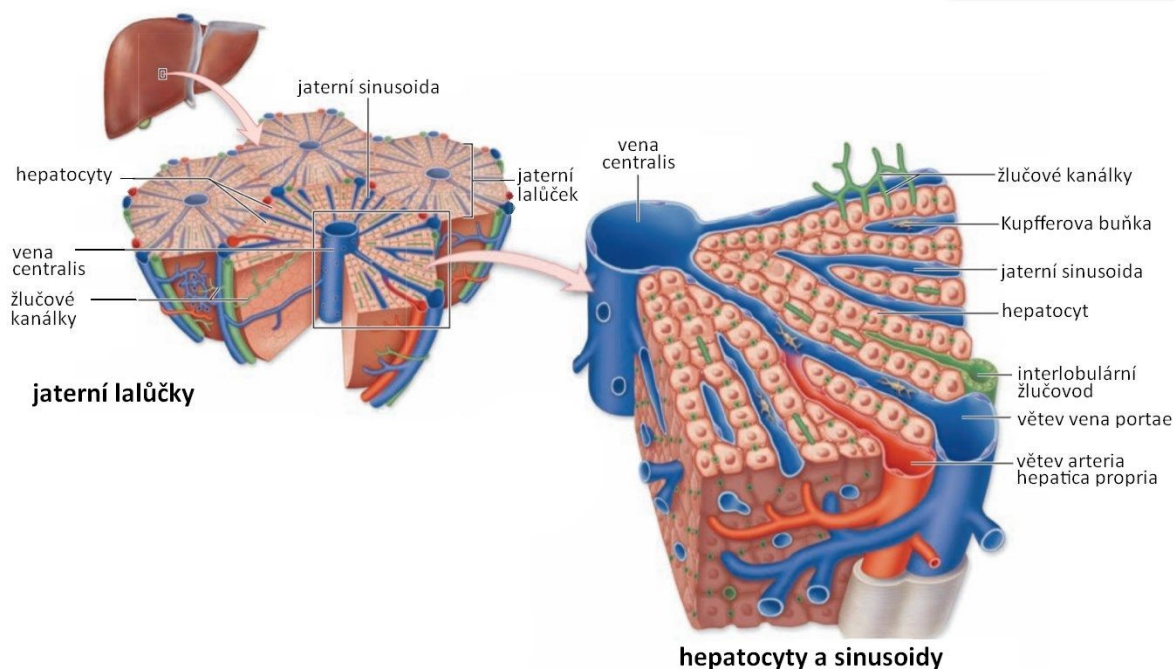
Orgán se skládá z jaterních buněk zvaných *hepatocyty*. Tvoří 60-70 % celkového objemu jater (2). Jsou to jednojaderné až dvoujaderné polygonální buňky s povrchem krytým mikrokly. Představují hlavní buňky orgánu a plní řadu jaterních metabolických funkcí (5). Od jiných buněk se liší velikostí a rozdílným množstvím organel. Obsahují velké množství lysosomů, inkluzí a mitochondrií, rozsáhlý *Golgiho aparát* a bohaté endoplazmatické retikulum. Svým seskupením vytváří jaterní buňky trámce, které se paprscitě sbíhají k centrální žíle (*vena centralis*) do útvaru lalůčku (*lobus*). Lalůček představuje morfologickou jednotkovou stavbu jater, v jejímž středu se nachází centrální žíla. Obvod lalůčku je tvořen vazivem a několika portobiliárními prostory. Každý prostor obsahuje trojici útvarů (tzv. *portální triáda*). Tu tvoří interlobulární venula, interlobulární arteriola a interlobulární žlučovod (1) (5).

Prostor mezi trámci je vyplněn *jaterními sinusoidy*, tenkostěnnými útvary charakteru kapilár. Jaterní sinusoidy mají nepravidelný tvar a jsou obklopeny fenestrovanými endotelovými buňkami. Mezi sinusoidy a hepatocytem se nachází *Disseův prostor* (1).

Na endotelu sinusoid jsou rozmístěny fagocyty zvané *Kupfferovy buňky*. Jedná se o makrofágy schopné pohlcovat škodlivé látky a erytrocyty. Další buňky obsažené ve struktuře

jater jsou *Itoovy buňky* a jaterní NK lymfocyty, tzv. *pit buňky*. Itoovy buňky mají nepravidelný hvězdovitý tvar a nejsou v tak hojném počtu jako hepatocyty. Mají na starosti skladování vitamínu A, sekreci vazivové matrix a produkci růstového faktoru nutnou pro regeneraci jater (1) (2). Schéma jaterního lalůčku a hepatocytu znázorňuje Obr. 2.

Obrázek 2. Schéma hepatocytu a lalůčku, převzato a upraveno z (5)



3.1.2 Jaterní oběh krve a žluče

Játra mají bohaté cévní zásobení zajištěné dvěma systémy: žilním systémem (*vena portae* a *vena cava inferior*) a jaterní tepnou (*arteria hepatica communis*). Oba systémy se postupně větví a vytváří interlobulární útvary portální triády (2) (3) (5).

Vena portae se dostává k játrům v *ligamentum hepatoduodenale*. Její větvi v portobiliárním prostoru je interlobulární venula. Přivádí krev ze střeva a sleziny obohacenou látkami získanými z potravy. *Arteria hepatica* zasahuje do zmíněného orgánu skrze svou větev *Arteria hepatica propria* vycházející z *Truncus coeliacus*. Její větvi v portobiliárním prostoru je interlobulární arteriola. Přivádí krev obohacenou kyslíkem (1). Vstupem do jaterních sinusoid se krev z obou systémů smísí a protéká přes jaterní sinusoidy do centrální žíly. Za pomoci fenestrace endotelu se dostává krevní plazma do *Disseho prostoru*, kde probíhá látková výměna mezi plazmou a hepatocyty. Centrální žíly z jednotlivých lalůčků se postupně spojují

a vytváří jaterní žíly (*venae hepaticae*). Ty přechází do intrahepatálního úseku dolní duté žíly (*vena cava inferior*) (5).

Mezi jaterními buňkami se nachází žlučové kanálky umístěných vždy na styku dvou buněk. Společně vytváří síť žlučových cest umístěných intrahepatálně a extrahepatálně. Intrahepatická část zahrnuje všechny žlučové cesty umístěné v játrech. Zodpovídá za tvorbu a transport žluče z jater. Žluč produkovaná v jaterních buňkách ve žlučových kapilárách přechází přes Heringovy kanálky do interlobulárních žlučovodů. Interlobulární žlučovody se postupně spojují do větších lalokových žlučovodů, které přechází do oblasti *porta hepatis* (1) (2) (5). Na tomto místě začíná extrahepatická část. Zde se žluč dostává do pravého a levého žlučovodu (*ductus hepaticus dexter et sinister*). Oba žlučovody se mezi sebou liší. Pravý žlučovod má kratší průběh a variabilnější větvení. Levý žlučovod má naopak delší průběh a méně variabilnější větvení. Oba se spojují poblíž Hilové ploténky do společného žlučovodu (*ductus hepaticus communis*), ke kterému je připojen vývod žlučníku. Odsud přechází žluč do duodena (2) (3).

3.1.3 Funkce

Játra vykonávají řadu funkcí. Pro zjednodušení je můžeme rozdělit do několika skupin: syntéza proteinů, cukrů a lipidů, udržení hladin aminokyselin a glukózy, tvorba žlučové kyseliny a bikarbonátů, exkrece pro velké hydrofobní metabolity, cizí látky a léky (6).

Játra jsou zodpovědná za syntézu až 90 % objemu cirkulujících bílkovin (např. fibrinogen, transferin, ...). Nejčastějším cirkulujícím proteinem je albumin. Tento protein je odpovědný za udržení krevního objemu a transport řady látek (7). Dále produkuje řadu dalších proteinů podílejících se na systémové regulaci, metabolizuje aminokyseliny a likviduje dusíkaté reaktanty prostřednictvím deaminace za tvorby močoviny (7) (8).

Játra udržují hladinu glukózy v krvi. Jsou schopná ukládat, uvolňovat, metabolizovat a syntetizovat glukózu podle aktuálního stavu. Při příjmu potravy dochází k syntéze a uskladnění glykogenu, stimulaci glykolýzy a zvýšené produkci inzulínu. V době lačnění klesá hladina glukózy a inzulínu, tento stav vede ke glukoneogenezi a glykogenolýze. V současné době vlivem nadměrné výživy zaznamenáváme častější případy porušení metabolismu glukózy a s tím související nárůst výskytu inzulínové rezistence. S tím bývá spojen nadměrný přísun mastných kyselin a jejich ukládání do jater (8).

Játra také zasahují do metabolismu lipidů. Provádí jejich syntézu, sekreci a příjem z potravy. Poskytují lipidové substráty, které v organismu slouží pro tvorbu tukové tkáně, fungují jako zdroje energie pro kosterní svalstvo a napomáhají absorpci v tucích rozpustných vitamínů. Játra se starají o homeostázu cholesterolu. Cholesterol může být stejně jako ostatní lipidy přijímán z potravy nebo syntetizován de novo v játrech. Jeho důležitost spočívá v potřebě tvorby buněčné membrány (8).

Nelze opomenout ani detoxikační funkci. Probíhá zde metabolismus hydrofobních a potenciálně toxických sloučenin v metabolity rozpustné ve vodě. Podobnému procesu podléhají také steroidy (7). Jejich biotransformace probíhá ve dvou fázích. V první fázi dojde k přeměně na více polární produkty. V druhé fázi vznikají hydrofilní látky, které jsou vyloučeny močí nebo žlučí. Mezi základní metabolické reakce patří hydroxylace, demethylace a dealkylace (7).

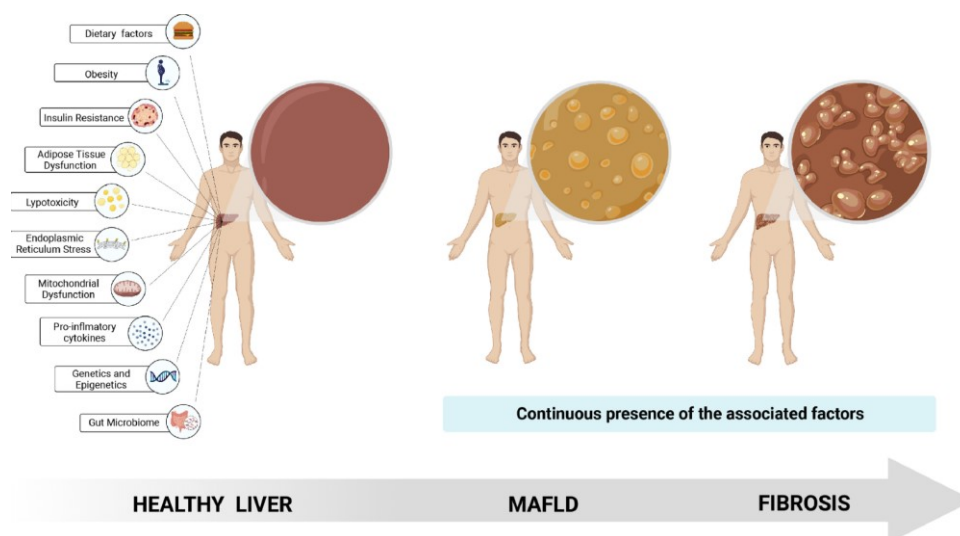
3.2 Onemocnění jater

Játra mohou být poškozena v důsledku působení toxických látek, léků a dlouhodobé nadměrné konzumace alkoholu. Další příčiny vedoucí k poškození jater představují autoimunitní procesy, virové infekce a genetická predispozice. U jaterních onemocnění se příznaky mohou objevit až v pokročilém stádiu, což zvyšuje zákeřnost onemocnění (6).

3.2.1 Ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí (MAFLD)

Mezi nejčastější jaterní onemocnění patří ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí (MAFLD). Jedná se o stav, kdy dochází k nadměrnému ukládání tuků (např. triglyceridy a estery cholesterolu) neboli k tvorbě steatózy přítomné u více jak 5 % hepatocytů (9). Původně bylo onemocnění označováno za nealkoholické ztukovatění jater (NAFLD), nově navržený název však lépe odráží vztah mezi onemocněním a metabolickým syndromem (10). Pojem metabolický syndrom se vztahuje k typickým poruchám metabolismu, kam řadíme obezitu, inzulinovou rezistenci, dyslipidemii a arteriální hypertenzi (10) (11). Tyto poruchy přispívají k rozvoji závažnějších stavů navozující jaterní dysfunkci (např. steatohepatitida, fibróza a cirhóza), viz Obr. 3. Zároveň jsou pacienti vystaveni zvýšenému riziku kardiovaskulárního onemocnění, osteoporózy, onemocnění ledvin a neurologických potíží (12) (13).

Obrázek 3. Příčiny MAFLD a důsledek progresse onemocnění (10)



*Healthy liver: Zdravá játra → MAFLD: Ztukovatění jater → Fibrosis: Fibróza
Příčiny: strava, obezita, inzulinová rezistence, tkáňová dysfunkce, lipotoxicita, stres endoplazmatického retikula, mitochondriální dysfunkce, prozánětlivé cytokiny, genetika a střevní mikrobióza*

Význam tohoto onemocnění stále roste v souvislosti s nárůstem výskytu obezity (9). Výzkumy ukázaly, že MAFLD postihuje více jak čtvrtinu běžné populace, především dospělé pacienty s nadváhou či obezitou (14). Udává se, že až 70 % pacientů s nadváhou trpí MAFLD (15). Úzká souvislost se změnou tělesné váhy poukazuje na řadu mechanismů vedoucích ke vzniku daného onemocnění (13).

3.2.1.1 Patogeneze

MAFLD charakterizujeme jako multifaktoriální onemocnění. Na vzniku a vývoji se podílí řada faktorů, např. genetika, nízká pohybová aktivita, nadměrný příjem sacharidů a mastných kyselin, změny v metabolismu lipidů (9) (11) (15).

Metabolismus lipidů významně zasahuje do patogeneze obezity a inzulínové rezistence (13). Mastné kyseliny získané z potravy či syntézou se esterifikací přeměňují na triacylglyceroly, následně jsou sestaveny do lipoproteinu. Přechází do oběhu, podléhají β -oxidaci v mitochondriích a ukládají se v lipidových kapičkách. V případě nadměrného příjmu živin nestačí organismus zpracovávat mastné kyseliny a dojde k navození lipotoxicity. Tento pojem charakterizuje tvorbu a akumulaci toxicky působících nasycených mastných kyselin (např. palmitát, ceramidy, volný cholesterol), které jsou schopné poškodit a usmrtit buňky (15) (16). Poškozen je také systém buněčného dýchání. Mastné kyseliny se hromadí v mitochondriích, které nejsou schopné je zpracovat. Akumulace lipidů vede k oslabení odolnosti mitochondrie vůči dalšímu poškození. To může vést až k navození buněčné smrti. Toxicita mastných kyselin se projevuje také dalším způsobem. Oxidací mastných kyselin dochází ke tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). V nadměrném množství ROS se ochranné antioxidační mechanismy přecerpají a následkem toho dojde k oxidačnímu stresu navozujícímu buněčné poškození (16).

Kromě toxického působení lipidů k rozvoji onemocnění přispívají další faktory: endotelin-1 (ET-1) a transformující růstový faktor beta-1 (TGF- β 1) představující profibrogenní mediátor. Dále se na patogenezi mohou podílet zánětlivé mediátory jako C-reaktivní protein, interleukin-6 (IL-6) a tumor nekrotický faktor α (TNF- α) (13).

Rozvíjející onemocnění zasahuje především neparenchymatózní jaterní buňky (hepatocyty), konkrétně jaterní sinusoidní endoteliální buňky (LSEC). Stávají se dysfunkčními

a tím napomáhají vzniku a vývoji zánětu (13). Může dojít až ke vzniku fibrózy, ale v porovnání s MASH, je zde pomalejší rozvoj (9).

3.2.1.2 Klinické symptomy

Ve většině případech je MAFLD vnímáno jako tiché onemocnění. Příznaky se mohou projevit až po vzniku cirhózy (9). V některých případech se projevují obecnější symptomy jako únava či nepohodlí v oblasti pravého horního kvadrantu. S nástupem cirhózy se může objevit splenomegalie, pavoučí angiomata, palmární erytém nebo ascites. Pacienti mívají mírně zvýšené aktivity jaterních enzymů alanintransaminázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). V některých případech však koncentrace ALT a AST vykazuje normální stav. Podobně tomu může být u alkalické fosfatázy a gama glutamyltransferázy. V případě hladiny bilirubinu obvykle dojde k jejímu navýšení až v pokročilejší fázi onemocnění. Základem pro určení přítomnosti MAFLD je proto diagnóza (17).

Samotná diagnóza spočívá v přítomnosti jaterní steatózy a jednoho ze tří možných kritérií: obezita, diabetes mellitus II. typu a metabolická dysregulace. Jaterní steatózu detekujeme pomocí zobrazovacích technik, biomarkerů, jaterní biopsie apod. Mezi zobrazovací techniky řadíme ultrasonografii, magnetickou rezonanci a počítačovou tomografii. Invazivní jaterní biopsie je zde tzv. „zlatým standardem“. Metabolická dysfunkce znamená přítomnost některých metabolických abnormalit – např. větší obvod pasu, vyšší krevní tlak, vyšší hladina triacylglycerolů, prediabetes a inzulinová rezistence (13) (15) (17) (18).

3.2.2 Steatohepatitida spojená s metabolickou dysfunkcí (MASH)

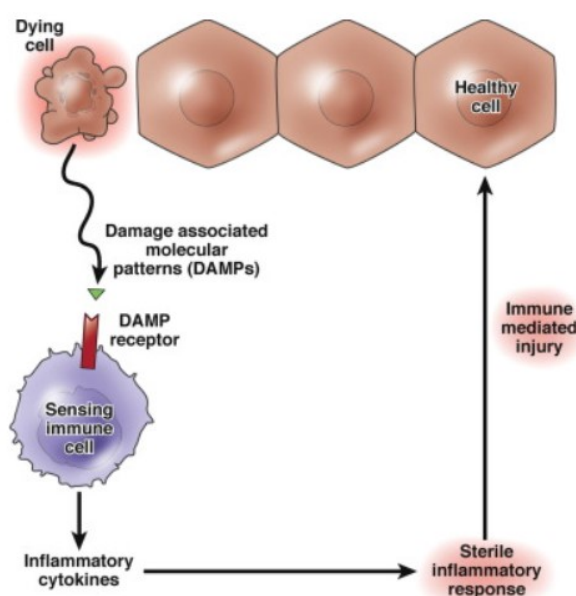
Steatohepatitida spojená s metabolickou dysfunkcí (MASH), dříve pojmenovaná jako nealkoholická steatohepatitida (NASH), je charakterizována jako chronické systémové jaterní onemocnění. Představuje závažnější stav vycházející z MAFLD. Na rozdíl od pouhého ztukovatění jater je MASH charakterizována poškozením hepatocytů, zánětem a vznikem fibrózy. Onemocnění progreduje do vzniku cirhózy, hepatocelulárního karcinomu a může navodit smrt spojenou s dysfunkcí jater. Jako systémové onemocnění negativně působí na srdce, svaly a ledviny (19) (20).

MASH postihuje stále větší počet pacientů. Z velké části jsou případy spojeny s nadváhou pacienta (21). Udává se, že u více než 90 % pacientů trpících obezitou a zároveň diabetem mellitem 2. typu byl diagnostikován MASH. V posledních letech byl zaznamenán nárůst případů transplantace jater v souvislosti s MASH, cirhózou a hepatocelulárním karcinomem (20). Ve Spojených státech amerických je toto onemocnění dokonce druhou hlavní příčinou k transplantaci jater a předpokládá se, že v budoucnu se může stát hlavní podmínkou k transplantaci (20) (22).

3.2.2.1 Patogeneze

Patogeneze onemocnění vychází z progresu MAFLD. O MASH lze mluvit ve chvíli, kdy dochází k poškození a usmrcení hepatocytů a v reakci na tento stav se spouští systém hojení ran (16). K usmrcení dochází vlivem akumulace lipidů, oxidačního stresu způsobeného ROS a vlivem mitochondriální dysfunkce (10) (20). Usmrcené hepatocyty uvolňují „molekulární vzory spojené s poškozením“ (DAMP), které modulují zánětlivou odpověď. Vysílají signály do okolních buněk (23) (24). Tím se aktivují celé řady buněk (imunitní buňky, Kupfferovy buňky, ...) a podporuje se nábor makrofágů (10) (20). To podporuje vznik zánětu jako imunitní odpověď na dlouhodobou nadměrnou akumulaci lipidů (20), viz Obr. 4.

Obrázek 4. Schéma působení usmrcených hepatocytů na imunitní systém (25)



Dying cell: Umírající buňky; DAMP: Molekulární vzory spojené s poškozením; Sensing immune cell: Imunitní buňka příjemce; Inflammatory cytokines: Prozánětlivé cytokiny; Sterile inflammatory response: Sterilní prozánětlivá odpověď; Immune mediated injury: poškození zprostředkované imunitou; Healthy cell: Zdravá buňka

Makrofágy zde hrají hlavní roli. V porovnání se zdravými játry vykazují zde profibrogenní a prozánětlivé vlastnosti (22). Dále prozánětlivé cytokiny indukované lipidy přispívají k zánětlivému stavu a poškození jater (20). Na zánětu se také podílí inflammasomový komplex Nod-like receptor protein 3, který je značně exprimován v makrofázích a monocytech, méně v hepatocytech a HSC. Jedná se o nejvíce popisovaného člena rodiny inflammasomových sensorových proteinů NLR. Jeho aktivací se spouští kaskáda vrcholící sekrecí interleukinů (např. IL-1 β) (26).

Dlouhodobé poškození podmiňuje vznik a vývoj fibrózy. Jaterní fibrózu charakterizujeme jako akumulaci proteinů extracelulární matrix (ECM) a tvorbu jizevnaté tkáně (20) (21). Akumulují se proteiny (např. kolagen, fibronectin a proteoglykany), tvoří pruhy a přemostěním vytváří vazby s cévami. Fibróza postupně přechází do stavu cirhózy, kdy se objevují regenerační uzliny (18). Cirhóza zesiluje rezistenci v intrahepatických cévách. To vede k portální hypertenzi a jaterní insuficienci. Zvyšuje riziko vzniku a vývoje hepatocelulárního karcinomu (20) (27).

Onemocnění postupuje do extrahepatického prostředí. Vyšší hladina krevních lipidů představuje závažné riziko nejen pro samotné onemocnění. Z jater se uvolňují částice lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) a lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL). Ty se přenáší krví z jater a hromaděním v cévách vytváří aterosklerotické platy. V oblasti kosterního svalstva se zhoršuje syntéza svalových proteinů, které hrají klíčovou roli v metabolismu. Snižuje se hladina adiponektinu, který působí příznivě na produkci inzulínu a svalových proteinů. Snižuje se podíl svalové hmoty a prohlubuje se inzulínová rezistence. Poškozený je také renální systém. Dochází k narušení funkce ledvin, narušení elektrolytové rovnováhy a ke sníženému vyloučení odpadních produktů (20).

3.2.2.2 Klinické symptomy

MAFLD a MASH mají mnoho společných symptomů. Obě onemocnění se charakterizují akumulací tuku a přítomností metabolické dysfunkce. Mohou vykazovat zvýšené hladiny jaterních transamináz signalizující poškození jaterních buněk (17) (12). V séru lze pozorovat zvýšené hladiny interleukinů v porovnání se zdravým stavem (26). Na rozdíl od pouhého ztukovatění jater však MASH vykazuje vyšší riziko úmrtí a vyšší četnost výskytu přidružených metabolických onemocnění. Mezi její charakteristické znaky patří tzv. balónkování

hepatocytů. Hepatocyty se významně zvětšují, obsahují nepravidelnou vláknitou cytoplazmu. Tento znak může také poukazovat na fibrózu (18). Na fibrózu či cirhózu může upozornit také hypoalbuminémie a trombocytopenie (17).

Pro určení diagnózy je třeba nejen přítomnost balónkových hepatocytů, zánětu, steatózy a případné fibrózy. Stejně jako u MAFLD je nutné provést jaterní vyšetření za použití jaterní biopsie nebo dalších neinvazivních postupů (zobrazovací techniky, hodnocení biomarkerů a další) (17) (12).

3.2.3 Význam zánětu v patogenezi MASH

O zánětu můžeme říct, že na základě různých okolností má dvojí roli. Při malé intenzitě působí protektivně. Napomáhá hojení ran, podporuje přirozenou regeneraci jater (16). Silné zánětlivé reakce naopak škodí. Poškozují jaterní parenchym, vyvolávají rozsáhlou ztrátu hepatocytů a prohlubují závažnost jaterních onemocnění (24).

U NASH/MASH představuje zánět základní rys onemocnění (25). Jak bylo uvedeno, zánět napomáhá přechodu do stavu fibrózy. Při akutním poškození hepatocytů se aktivují hepatické hvězdicové buňky (hepatice stellate cells, HSC), které se trans-diferenciací přeměňují na myofibroblasty produkující kolagen. Poškozené hepatocyty dále podporují nádorové bujení, aktivaci lymfocytů a makrofágů. Ty prostřednictvím sekrece prozánětlivých cytokinů aktivaci a následnou transdiferenciaci HSC podpoří (23). Vlivem chronického poškození dochází k nadprodukci ECM nahrazující hepatocyty. Akumulace je dána nejen zvýšenou syntézou, ale také nedostatečnou degradací. HSC také produkuje zánětlivé cytokiny a podporuje aktivaci lymfocytů (27).

Játra nejsou jediným místem, které podléhá zánětu. Prozánětlivé mediátory se mohou krevním řečištěm transportovat do dalších orgánů, kde podporují patogenezi a přispívají tak k systémovému důsledku onemocnění na organismus (20).

Cytokiny inhibují působení oxidu dusnatého (NO), zvyšují produkci ET-1, podporují expresi adhezních molekul. To vede k navození endotelové dysfunkce. Usnadňují tak tvorbu aterosklerotických platů. S dysfunkcí endotelu, systémovým zánětem a aterosklerózou je spojen vznik a vývoj onemocnění jako ischemie srdce a srdeční selhání (20).

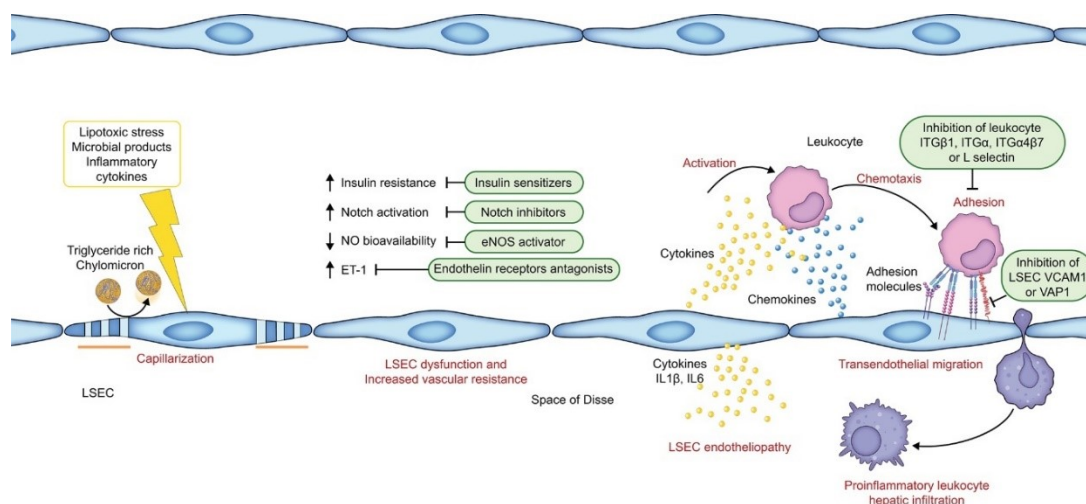
Prozánětlivé mediátory v renálním systému vyvolávají chronické poškození ledvin (20). Stejně jako v jiných orgánech zde dochází k aktivaci myofibroblastů, akumulaci ECM a tvorbě renální fibrózy (28).

3.2.4 Dysfunkce jaterních sinusoid

Jaterní sinusové endoteliální buňky (LSEC) jsou specializované buňky endotelu. Zahrnují pouze 3 % celkového objemu jater. Regulují fibrózu, působí protizánětlivě, zabývají se regenerací jater po akutním poškození. Dále inhibují aktivaci Kupfferových buněk a HSC. Za fyziologického stavu podporují produkci protizánětlivých cytokinů (29) (30).

V případě dlouho trvajícího jaterního poškození dochází k utlumení ochranných funkcí LSEC. Tento stav může vést až k dysfunkci jaterních sinusoid. Z původního protizánětlivého fenotypu se přechází na prozánětlivý fenotyp. Dochází ke zvýšené expresi adhezních molekul a rozvíjí se zánět (30).

Obrázek 5. Schéma poškození LSEC (31)



Kapilarizace → LSEC dysfunkce a nárůst vaskulární rezistence → LSEC endotheliopatie → Transendoteliální migrace → Prozánětlivé leukocyty → Jaterní infiltrace

Kapilarizace: lipotoxický stres, mikrobiální produkty, prozánětlivé cytokiny, chylomykrony bohaté na triglyceridy

LSEC dysfunkce: nárůst inzulinové rezistence, zvýšená aktivace Notch, snížená biodostupnost NO, nárůst ET-1

LSEC endoteliopatie: cytokiny IL-1β a IL-6, chemokiny, aktivace leukocytů prostřednictvím cytokinů a chemokinů

Transendoteliální migrace: nárůst adhezních molekul vlivem cytokinů a chemokinů, adheze leukocytů

Vlivem progresu MAFLD a jejího přechodu do MASH podléhá LSEC řadě změn, včetně kapilarizace, dysfunkce a „endoteliopatie“ (31). Schéma změn při poškození LSEC je znázorněno na Obr. 5.

V počáteční fázi dochází ke kapilarizaci LSEC. Jde o ztrátu LSEC fenestrace, která zajišťuje permeabilitu sinusoid. Jejich zúžením se snižuje průchod molekul, čímž je zabráněno látkové výměně. Prostřednictvím zvýšeného ukládání chylomykonů v cévním řečišti podporuje steatózu (29) (31) (32).

Vlivem balónkových hepatocytů je vyvíjen mechanický tlak na mikrocirkulaci a prohlubuje se tak vaskulární rezistence. LSEC nejsou schopny produkovat a dostatečně reagovat na vasodilatátory (NO, cyklooxygenázu a prostaglandin I₂). Naopak se zvyšuje produkce vazokonstrikčně působících molekul (ET-1, tromboxan A₂ a angiotenzin II). Vaskulární rezistence také podporuje inzulinovou rezistenci. Bylo též zjištěno, že endotelově specifická aktivace Notch je schopná ovlivnit endoteliální syntázu oxidu dusnatého (eNOS) a tím snížit produkci NO (29) (31).

Endoteliopatie představuje proces prozánětlivého fenotypu LSEC zasahujícího do transmigrace leukocytů z krevního řečiště (33). Poškozené sinusoidy uvolňují zánětlivé chemokiny a cytokiny (TNF- α , IL-6 a IL-1 β) schopné podporovat přísun leukocytů (29) (32). Podobný účinek mají adhezní molekuly, které se také účastní rozvoje LSEC dysfunkce. Jejich produkci podporují prozánětlivé mediátory vylučované z poškozených hepatocytů (31).

V důsledku těchto změn se ztrácí regenerační schopnost, zvyšuje se inzulinová rezistence, podporuje se progresu MASH a její vývoj do stavu fibrózy (29).

3.2.5 Adhezní molekuly

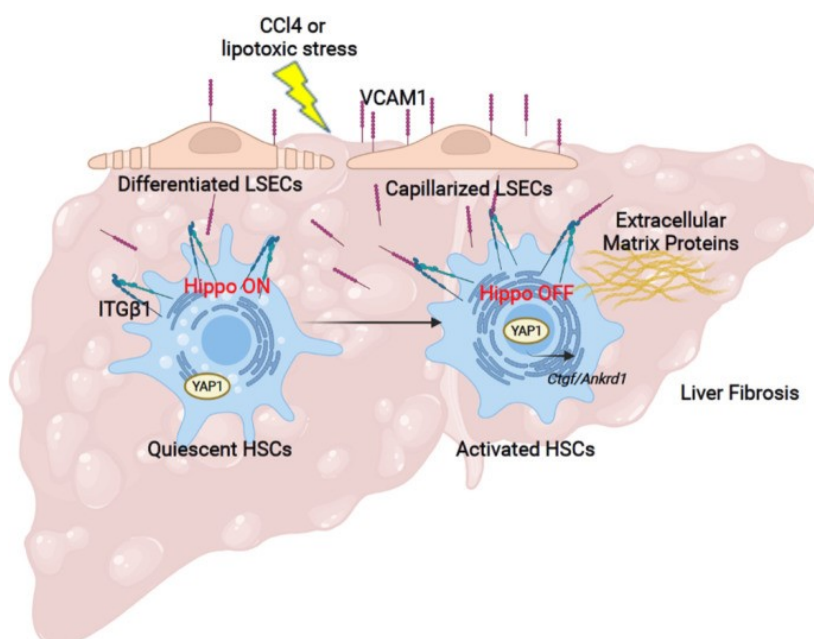
Na zánětu se podílí řada adhezních molekul (32). Jejich funkce je podmíněna tvorbou vazeb mezi adhezními molekulami na povrchu endotelu a jejich partnery na leukocytech (33). Uvedeme zde dva známé zástupce: vaskulární buněčná adhezní molekula-1 (VCAM-1) a intercelulární buněčná adhezní molekula-1 (ICAM-1). Všechny molekuly jsou produkovány buňkami endotelu (LSEC) a, jak se na základě předchozích studií prokázalo, podílí se na řadě onemocnění, podporují rozvoj zánětu a fibrózy jater, podílí se také na rozvoji angiogeneze a nádorového bujení (30) (32).

3.2.5.1 VCAM-1

VCAM-1 je adhezí molekula podobná imunoglobulinu. Je běžně exprimována endotelovými buňkami, především LSEC. V reakci na zánět se její exprese zvyšuje (30) (34) (35). Váže se na integriny $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ a $\alpha 4\beta 1$, které jsou exprimované na lymfocytech, monocitech a eozinofilech. Díky tomu vytváří pevnou adhezi leukocytů k endotelu, což je základní krok v procesech zánětu (35) (36).

Na změnu exprese působí také lipidy. Např. lipotoxický palmitát je schopen upregulovat VCAM-1 prostřednictvím dráhy zahrnující kinázy 3 smíšené linie MAP3K (34). Expres VCAM podpořená toxickými lipidy usnadňuje aktivaci HSC prostřednictvím signální dráhy YAP1. Dále také podporuje kapilarizaci LSEC a napomáhá rozvoji fibrózy, viz Obr. 6. Blokováním můžeme zmírnit profibrogenní účinek VCAM-1 na vývoj jaterní fibrózy vyvolané ztukovatěním jater (30) (36).

Obrázek 6. Funkce VCAM-1 při rozvoji jaterní fibrózy (36)



lipotoxic stress: lipotoxický stres; differentiated LSECs: diferencované buňky LSEC; capillarized LSEC: kapilární buňky LSEC; ITGB1: integrin $\beta 1$; Hippo: cílový protein Hippo dráhy YAP1; Extracellular matrix proteins: proteiny extracelulární matrix; Quiescent HSCs: klidové buňky HSC; Activated HSCs: aktivované buňky HSC; Liver fibrosis: Jaterní fibróza

3.2.5.2 ICAM-1

ICAM-1 charakterizujeme jako transmembránový glykoprotein ovlivňující řadu imunitních odpovědí. Jeho expresi mají na starosti převážně buňky vaskulárního endotelu,

dále imunitní a epitelální buňky. Byla pozorována upregulace v případě zánětu, fibrózy, cirhózy, ale také u různých forem nádoru. Nadměrná exprese je způsobena vlivem prozánětlivých mediátorů jako endotoxiny, TNF- α a IL-1 (37) (38).

Jeho funkce spočívá v transportu leukocytů. V rámci interakce se svým ligandem přispívá k přenosu leukocytů a dalších imunitních buněk do jaterní tkáně. V případě nádoru se zde setkáváme s rozpustnou formou ICAM-1, která podporuje sekreci proangiogenního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (39). Blokováním ICAM-1 bráníme přenosu a adhezi nádorových buněk (30).

3.2.6 Význam Mac-2 v imunitním systému

V případě onemocnění související s metabolickými obtížemi dochází také ke zvýšení hladiny galectinu-3 (známý také jako Mac-2). Jedná se o glykoprotein ze skupiny lektinů produkovaný imunitními buňkami (40) (41). Jeho exprese je výrazně zvýšena vlivem zánětlivých stavů (40). Vyskytuje se v cytoplazmě, v jádře a můžeme jej nalézt také v extracelulárním prostoru. Působí adhezně, zasahuje do signálních drah růstu a diferenciaci buněk (42).

Jeho účinky při steatohepatitidě jsou rozporupné. Může vykazovat prozánětlivé i protizánětlivé účinky. Je schopen likvidovat produkty lipotoxicity. Zároveň může zasahovat do exprese TGF- β 1, čímž potlačuje přirozenou funkci imunitního systému. Působí také profibroticky prostřednictvím aktivace makrofágů a myofibroblastů, stimuluje diferenciaci a ukládání fibroblastů do extracelulární matrix (40) (41) (42).

Mac-2 se podílí na onemocněních jater a dalších orgánů (např. virové infekce, hepatocelulární karcinom, selhání jater, onemocnění způsobené konzumací alkoholu a další). S ohledem na spolehlivost sérových a tkáňových hladin je Mac-2 považován za spolehlivého ukazatele pro diagnózu (42). V této diplomové práci jsme Mac-2 použili jako marker infiltrace makrofágů během MASH.

3.3 Experimentální modely MASH/NASH

Vzhledem ke stále narůstajícímu počtu případů MASH je kladen velký důraz na zdokonalení současných znalostí o patofyziologii MASH a postupů léčby metabolického onemocnění. Klíčovou roli zde hraje výběr vhodných experimentálních modelů. V případě MASH/NASH však dlouhou dobu nebylo možné nalézt zvířecí model vhodný ke studiu onemocnění (43) (44).

Model musí splňovat několik důležitých kritérií. Musí přesně odrážet stejnou patogenezí a postupný vývoj onemocnění jako je tomu v lidském organismu (45). Dále by tu měly být přítomné typické znaky metabolického syndromu (nadváha, inzulinová rezistence, hyperglykemie, dyslipidemie, ...). Při studiu je třeba počítat se stravovacími návyky a životním stylem pacienta. Dále je třeba také vzít v potaz další faktory účastnící se onemocnění: genetická predispozice, metabolická regulace, mimojaterní zánět a další (44) (45). V praxi se proto používají modely upravené chemicky nebo nutričně. Dietní úprava spočívá v aplikaci speciální výživy, při které se navodí stav odpovídající patogenezí příslušného onemocnění (44) (46). V případě chemické úpravy modelů jsou aplikována chemická činidla, např. tetrachlormethan (CCl_4). Tento způsob modifikace se uplatňuje při studiu vývoje onemocnění (44). Také se uplatňují geneticky upravené modely, které lépe odrážejí metabolické dráhy během progresu (47). Ne všechny modely proto lze uplatnit při preklinickém studiu NASH/MASH. Několik modelů nevykazuje přechod do zánětlivého stavu (45). Jiné naopak lépe odrážejí rozvoj zánětu a fibrózy. Musíme počítat, že každý model má své limity a nemůže zcela napodobit lidský organismus (43) (44).

Výběr modelu také závisí na dalších faktorech. Jedná se o druh, pohlaví, kmen zvířete a typ krmiva. Nejčastěji se používají modely hlodavců (myši, krysy, potkani). Bylo upozorováno, že samci jsou na steatózu citlivější než samice (44). Nejběžnější diety pro studie NASH/MASH jsou prodloužené diety s vysokým obsahem tuku (HFD) a diety s nedostatkem methioninu a cholinu (MCD) (26).

3.3.1 Dieta s nedostatkem methioninu a cholinu (MCD)

Tato dieta zahrnuje vysoký podíl sacharózy (40 %) a tuků (10 %), ale chybí methionin a cholin. Obojí je nutné k beta-oxidaci a produkci VLDL. Následkem je akumulace tuků, přítomnost oxidačního stresu, rozvoj steatózy, zánětu a fibrózy. Oproti lidskému MASH

modely ztrácí váhu, mění se citlivost na inzulín a mění se metabolický profil. Výhodou této diety je široká dostupnost a prokazatelné projevy MASH v krátkém časovém intervalu (do 10. dne). Fibrotické změny se vyvíjí do 8.-10. týdne (47) (46).

3.3.2 Dieta s deficitem L-aminokyseliny a nedostatkem cholinu (CDAA)

Tato dieta vychází z MCD diety. Má stejné složení, ale oproti MCD jsou zde směsi L-AMK nahrazující proteiny. Navodí se tak stav s charakteristickými rysy steatohepatitidy s možností dalšího rozvoje. U myší se po šesti týdnech projevuje steatóza a zánět. Oxidace mastných kyselin je snížena, naopak podpořena je syntéza lipidů. Je zde však pomalejší vývoj fibrózy. Modely nepřibývají na váze, neobjevuje se inzulínová rezistence (46) (44).

3.3.3 Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD)

HFD představuje typ diety s velkým množstvím variabilit. Byly pozorovány rozdíly podle druhu zvířete, kmene zvířete a složení aplikované diety. Tuk obvykle zahrnuje 45-75 % z celkového příjmu kalorií. Jedna z nejtypičtějších variant diety obsahuje 60 % kcal z tuku, 20 % kcal z bílkovin a 20 % kcal ze sacharidů (46) (44) (47).

Jednotlivé zvířecí druhy různě reagují na HFD. U samců potkanů se už po třech týdnech rozvinula inzulínová rezistence a navýšila se hladina prozánětlivých mediátorů. (61) Jinak tomu bylo u myších samců kmene WT C57BL/6. Až po 10 týdnech je u nich možné pozorovat obezitu, vyšší hladiny inzulínu, cholesterolu a intolerance glukózy. Zánět se objevuje až po 19. týdnu. Kolem 36. týdne se navyšuje hladina ALT a AST (46) (44).

3.4 Endoglin

Endoglin (označen jako CD105 nebo Eng) je 180kDa transmembránový glykoprotein typu 1 vystupující jako součást komplexního receptoru transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β). Je především produkován aktivními buňkami endotelu a hraje klíčovou roli v průběhu angiogeneze, vaskulogeneze a homeostázy. Bylo také zjištěno, že může být produkován jinými typy buněk, např. buňkami imunitního systému nebo nádorovými buňkami (48). Od roku 1990, kdy byl identifikován, proběhlo několik výzkumů zaměřených na endoglin a dosud nebyla zcela objasněna jeho role při patologických změnách (49).

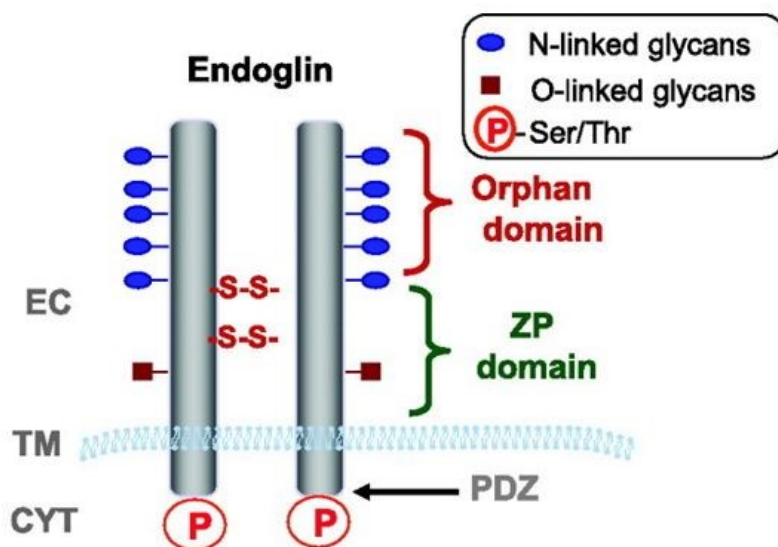
3.4.1 Struktura

Jedná se o homodimer, složený z podjednotek vázaných na disulfatu o velikosti přibližně 95kDa (50). Existuje ve dvou variantách: membránový endoglin a solubilní neboli rozpustný endoglin (sEng) (51).

Strukturu membránového Eng můžeme rozdělit na tři základní části: velká extracelulární část obsahující 561 aminokyselin, hydrofobní transmembránová část a krátká cytoplazmatická část bohatá na serin/threonin. Strukturně jej řadíme do rodiny proteinů zona pellucida (ZP), jejímž společným znakem je ZP doména. Jedná se o úsek složený z 260 aminokyselinových zbytků nacházející se v extracelulární oblasti. V této oblasti se nachází také NH₂-terminálová doména (tzv. orphan doména). Dále se zde nachází N-glykosylační místa a pravděpodobně také O-glykosylační místo. Na rozdíl od ZP domény, která má na starost interakce s proteiny, nevykazuje orphan doména žádnou homologii s jinými proteiny (50).

Na krátké cytoplazmatické části Eng se nachází řada míst k fosforylaci. Podle studií jsou to právě serinové a treoninové zbytky, kde k tomu dochází. Fosforylace Eng je regulována PDZ-ligandujícím tripeptidylovým motivem (Ser-Ser-Met-Ala) vyskytujícím se na karboxylovém konci. Na Obr. 7 je znázorněna struktura membránového Eng (50) (52).

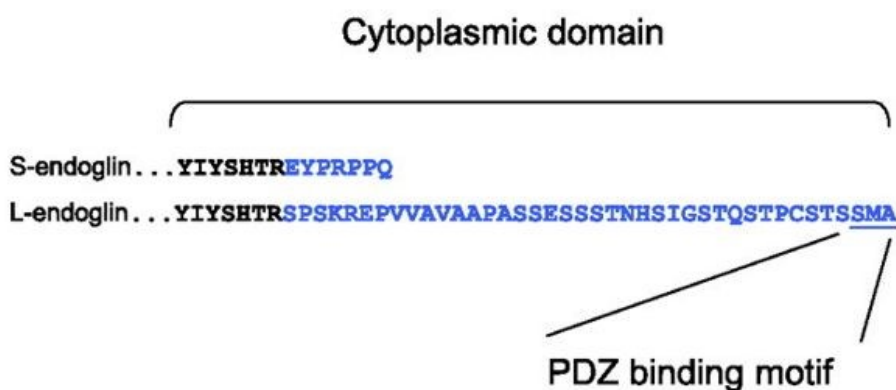
Obrázek 7. Struktura membránového endoglinu, převzato a upraveno z (50)



EC: extracelulární část, TM: transmembránová část, CYT: cytoplazmatická část, ZP domain: oblast rodiny proteinů zona pellucida, Orphan domain: NH₂terminálová doména, PDZ: tripeptidový motiv zprostředkovávající interakci na karboxylovém konci, P: místo pro fosforylaci, N-linked glycans: N-vazebné glykosidové místo, O-linked glycans: O-vazebné glykosidové místo

Jsou známy dvě izoformy membránového endoglinu: L-endoglin (L-Eng) a S-endoglin (S-Eng). Jejich rozdíl spočívá v různé délce cytoplazmatického konce (48), viz Obr. 8. L-Eng obsahuje cytoplazmatický řetězec se 47 aminokyselinami. S-Eng má kratší cytoplazmatický řetězec složený ze 14 aminokyselin (51).

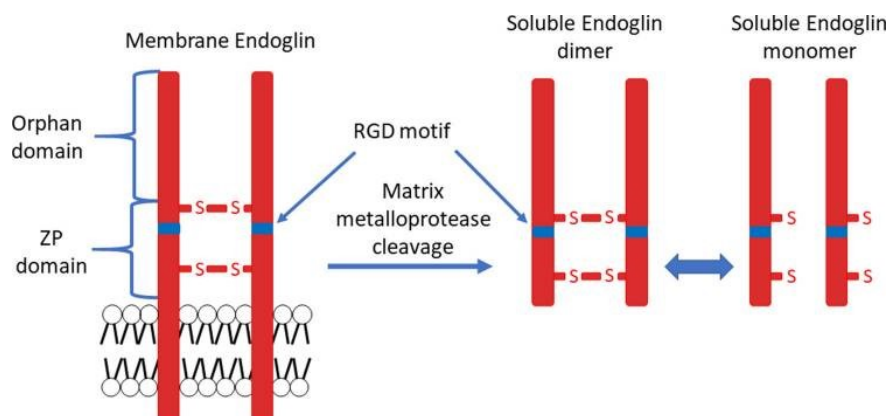
Obrázek 8. L-Eng a S-Eng, převzato a upraveno z (50)



Cytoplasmic domain: Cytoplazmatická doména; PDZ binding motif: PDZ vazebný motiv

Rozpustná forma Eng vzniká štěpením membránové varianty v extracelulární doméně za pomoci matrixových metaloproteináz (např. MMP-1, MMP-12, MMP-14), viz Obr. 9. Nově vzniklý sEng může existovat jako monomer nebo dimer. Jeho hladiny bývají zvýšeny při metabolických nebo kardiovaskulárních poruchách, rakovině nebo preeklampsii (49) (51). Přispívá k rozvoji řady onemocnění (53).

Obrázek 9. Schéma vzniku sEng (51)



Membrane Endoglin: Membránový endoglin; Orphan domain: Sirotčí doména; ZP domain: ZP doména; RGD motif: RDG motiv; Matrix metalloprotease cleavage: Štěpení pomocí matrixových metaloproteináz; Soluble Endoglin: Rozpustný endoglin

Eng je přítomný v lidském i zvířecím organismu, nicméně s jistými rozdíly. Lidský Eng obsahuje peptidovou sekvenci arginin-glycin-asparagovou kyselinu (RGD) v extracelulární části. (54) Tento motiv chybí u myších, prasečích, potkaních a psích endoglinových proteinů (48). Tripeptid RGD je klíčová rozpoznávací struktura, kde dochází k interakcím (55) (56).

3.4.2 Proces signalizace

Jak bylo uvedeno dříve, Eng tvoří komplex receptoru TGF- β . TGF- β je cytokin, který ovlivňuje velké množství biologických procesů jako například růst, diferenciaci, migraci a apoptózu buněk. Je také nezbytný pro embryonální vývoj. Podílí se také na imunitní regulaci a hojení ran. Změny v dráze mohou vést k různým typům onemocnění. Je známo více než 40 členů řadící se pod TGF- β , které zahrnujeme do několika skupin. Jedná se o TGF- β s, kostní morfogenetické proteiny (BMP), růstové a diferenciační faktory a aktiviny (57).

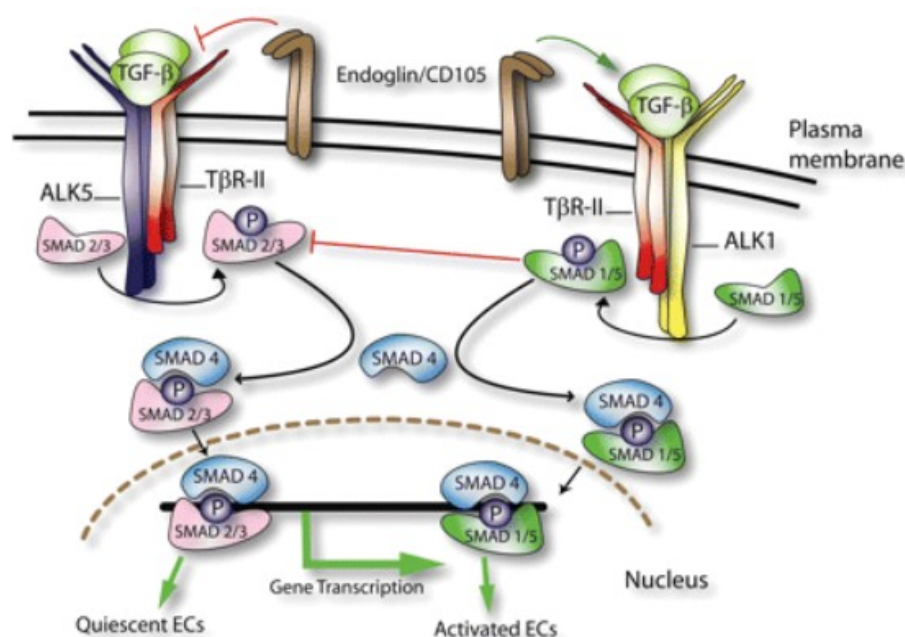
Členové TGF- β se vážou na serin/treonin kinázové receptory 1. a 2. typu v heteromerním komplexu. Bylo zjištěno, že u lidí existuje sedm TGF- β typu I, kam patří activin receptor-like kináza 1 (ALK1) a activin receptor-like kináza 5 (ALK5), a pět TGF- β typu II. Celý proces

signalizace probíhá následovně. Po vazbě ligandu na receptor 2. typu dojde k fosforylaci a aktivaci receptoru 1. typu. Následuje interakce s proteiny SMAD, které jsou zároveň transkripčními faktory. Ty zprostředkovávají intracelulární signalizaci pro nadrodinu TGF- β . U lidí se na aktivované receptory váže Smad1, 2, 3, 5 a 8. Pro kaskádu TGF- β a aktiviny jsou typické SMAD 2 a SMAD 3, pro signalizaci BMP jsou naopak typické SMAD 1, SMAD 5 a SMAD 8. Po navázání dochází k jejich fosforylaci receptorem 1. typu. Vytváří se komplex, dochází k jaderné translokaci a transkripci cílových genů. Tímto způsobem je zajištěn intracelulární přenos signálu (52) (57) (58).

Eng se váže na několik zástupců nadrodiny TGF- β , konkrétně na TGF- β 1 a TGF- β 3. Na TGF- β 2 se naopak neváže. Dále je prokázána interakce na kostní morfogenetický protein BMP-2 a BMP-7 (38). Nutno dodat, ačkoliv se Eng označuje za TGF- β receptor typu III, nelze ho zcela považovat za receptor, protože pro vytvoření vazby vyžaduje přítomnost signálních receptorů typu I (T β R-I) a II (T β R-II) (58). Signální receptory vyžaduje zejména při interakci s TGF- β 1, BMP2 a BMP7. Ovšem interakce s TGF- β 3 a BMP9 může proběhnout zcela nezávisle na pomocných receptorech (57).

Rozdíly mezi izomery L-Eng a S-Eng nespočívají pouze v jejich odlišné struktuře, ale také v odlišné funkci. Podle srovnávacích studií má S-Eng antiangiogenní účinek, zatímco L-Eng vykazuje proangiogenní účinek (50). Také vykazují rozdíl v signalizaci. Obě izoformy mohou interagovat s ALK1 a ALK5, ale L-Eng vykazuje vyšší afinitu k ALK1 a fosforylace se provádí na SMAD 1 a 5. S-Eng naopak upřednostňuje interakci s ALK5 a fosforylace je provedena SMAD 2 a 3. Právě rozdílnost drah má za následek rozdílnost výsledného působení Eng. S-izomer působí především tlumivě, L-izomer aktivuje (38) (50). Schéma signalizace pro oba izomery je znázorněno na Obr. 10.

Obrázek 10. Schéma signalizace Endoglinu (38)



Vazba TGF-β na membránový komplex obsahující receptory TβR-II a ALK5 → navázání SMAD2/3 → fosforylace SMAD2/3 → vazba mezi SMAD2/3 a SMAD4 → aktivní komplex → transkripce v jádře → aktivace buněk

Vazba TGF-β na membránový komplex obsahující receptory TβR-II a ALK1 → navázání SMAD1/5 → fosforylace SMAD1/5 → vazba mezi SMAD1/5 a SMAD4 → aktivní komplex → transkripce v jádře → klidový režim buněk

3.4.3 Fyziologická a patologická role endoglinu

Eng je exprimován především endotelovými buňkami, dále buňkami hladkého svalstva cév, fibroblasty, jaterními hvězdovitými buňkami a aktivovanými monocyty a makrofágy (48). Hepatocyty se na rozdíl od ostatních jaterních buněk na expresi Eng nepodílejí (59). U každého typu buňky vykonává určitou funkci. V makrofázích slouží k vyvolání imunitní odpovědi. V myofibroblastech ovlivňuje diferenciaci a podporuje expresi kolagenu. U mezenchymálních kmenových buněk napomáhá regulaci proliferace T-buněk. V době těhotenství reguluje diferenciaci a invazi trofoblastu a její expresi mají na starosti placentární syncytiotrofoblasty (60).

Eng hraje nezanedbatelnou roli v kardiovaskulárním systému. Má vliv na enzym eNOS, který má zásadní význam v rámci produkce NO a udržení správné funkce cévního endotelu (51) (61). Eng také ovlivňuje aktivitu a expresi cyklooxygenazy-2 (62).

Jeho koncentrace je regulována pomocí TGF- β , BMP a hypoxií. Exprese Eng není výhradně závislá pouze na transkripční úrovni, ale také na tvorbě sEng (48). Tento typ Eng narušuje cévní remodelaci a zapříčiňuje vznik abnormalit. Zvýšená exprese sEng může vést k preeklampsii – onemocnění postihující těhotné ženy (48) (63). Je spojen i s jinými druhy onemocnění spadající pod kardiovaskulární patologii jako např. srdeční selhání, infarkt myokardu, arteriální hypertenze a ateroskleróza. Je známá také souvislost mezi sEng a poruchou metabolismu a onemocněním jater (60).

Dále je exprese ovlivněna stavem pacienta. V klidovém stavu zdravé buňky hladkého svalstva produkují nízkou hladinu Eng (50). Změny v expresi a funkci Eng jsou převážně spojeny s několika patologickými stavy, včetně nádorových onemocnění, angiogeneze, vývoje srdce, fibrózy, dysfunkce endotelu a zánětu (51). Exprese a funkce Eng může být také změněna genetickou mutací. Typickým příkladem je onemocnění Hereditární hemoragické teleangiektázie (HHT) (64). Jedná se o dědičné autonomní vaskulární onemocnění vyskytující se ve dvou formách – HHT1 a HHT2. Jejich rozdíl spočívá v mutaci na různém genu. Pro HHT1 je typická mutace v genu Eng, HHT2 je způsobena mutací genu ALK1 (50).

Vzhledem k vysoké selektivitě se Eng dá využít jako cíl pro zobrazování nádorů. Zároveň by mohl sloužit jako selektivní cíl pro léčbu některých typů rakoviny (49).

3.5 Význam endoglinu v jaterní patologii

Jak již bylo zmíněno, Eng se podílí na vzestupu řady onemocnění jater, metabolismu a kardiovaskulárního systému. Jako biomarker u chronických onemocnění v souvislosti s poruchou metabolismu (např. diabetes mellitus, arteriální hypertenze a preeklampsie) působí sEng. Dosavadní poznatky poukazují na nezanedbatelný význam Eng v patogenezi onemocnění (50) (51).

3.5.1 Endoglin a MAFLD/MASH

TGF- β se podílí na jaterním onemocnění od počátečního poranění po dysfunkci orgánu. Jako profibrotický cytokin je schopen vyvolat fibrózu v ledvinách (28), játrech a myokardu (65). V játrech aktivuje fibroblasty vyvolávající nadprodukcí ECM a jiných proteinů jako MMP. Uplatňuje zde především signalizaci přes aktivaci ALK5 a fosforylaci SMAD 2/3 (48) (66). Nicméně některá studia naznačují, že i signalizace vedená přes ALK1 a SMAD 1/5/8 podporuje vývoj fibrózy. Proto nelze přesně vymezit roli jednotlivých drah (67).

Eng hraje významnou roli v jaterní patologii. Má vliv na funkci LSEC a na rozvoj endotelové dysfunkce (30). Předpokládá se, že změny exprese Eng od fyziologické normy, ať už se jedná o zvýšení či snížení exprese, vedou k porušení bariérové funkce endotelu (53).

Dosavadní studie prokázaly zvýšenou hladinu sEng již během hypercholesterolemie. V případě steatohepatitidy lze očekávat nadměrnou expresi rozpustné formy Eng, dále také enzymu MMP-14 a proteáz odpovědných za vyšší uvolňování sEng do oběhu. Objasnění vztahu mezi Eng a vývojem MASH je nadále ve fázi výzkumu. Ačkoliv neznáme zcela mechanismus, kterým se sEng nebo Eng podílí na onemocnění MAFLD a MASH, můžeme na základě studií předpokládat, že rozpustná forma je schopna ovlivnit metabolismus cholesterolu a progresi onemocnění (66) (67).

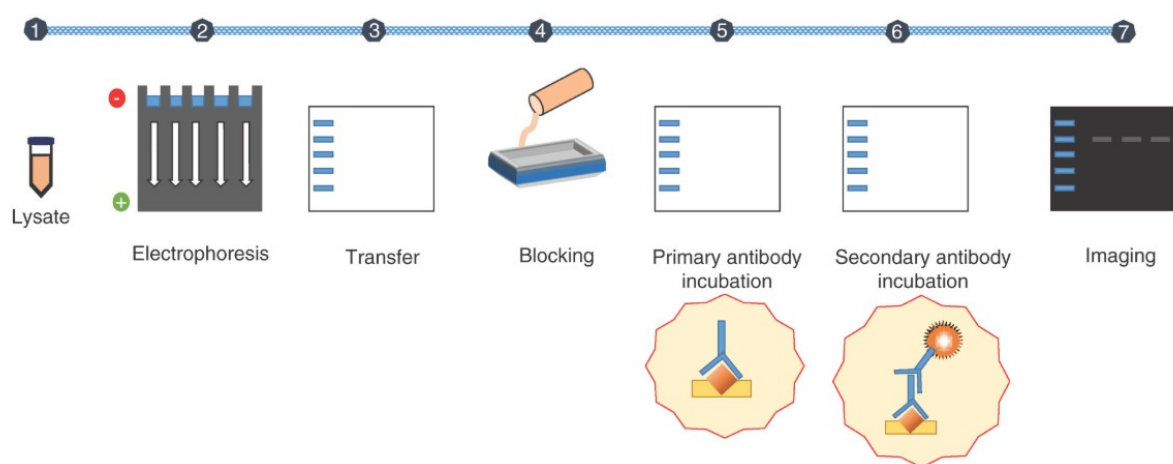
Není zcela jasné postavení izomerů L-Eng a S-Eng v onemocněních MAFLD a MASH. V případě jaterní fibrózy up-regulují buňky HCS za pomoci trans-diferenciace expresi Eng (48). Buňky HSC podporují produkci především L-Eng. Tento izomer upřednostňuje signalizaci přes dráhu TGF- β -ALK1-SMAD 1/5/8. Bylo zjištěno, že snižuje hladinu kolagenu a působí tak protektivně. Některé studie však naznačují, že Eng může podporovat progresi fibrózy (66) (68).

3.6 Princip western blot analýzy

Metoda western blot neboli proteinový imunoblot je určena k identifikaci a kvantifikaci specifického proteinu ve směsi získané z buněk či tkání (69). Je velmi často používána k separaci, detekci a identifikaci různých klíčových proteinů (70). Běžně se používá k diagnóze onemocnění (69).

Celý proces rozdělujeme do několika kroků. Jednotlivé kroky jsou znázorněny na Obr. 11. (70).

Obrázek 11. Schéma jednotlivých kroků western blot analýzy (70)



*Příprava vzorku → Elektroforéza → Přenos → Blokování → Inkubace primární protilátkou
→ Inkubace sekundární protilátkou → Detekce*

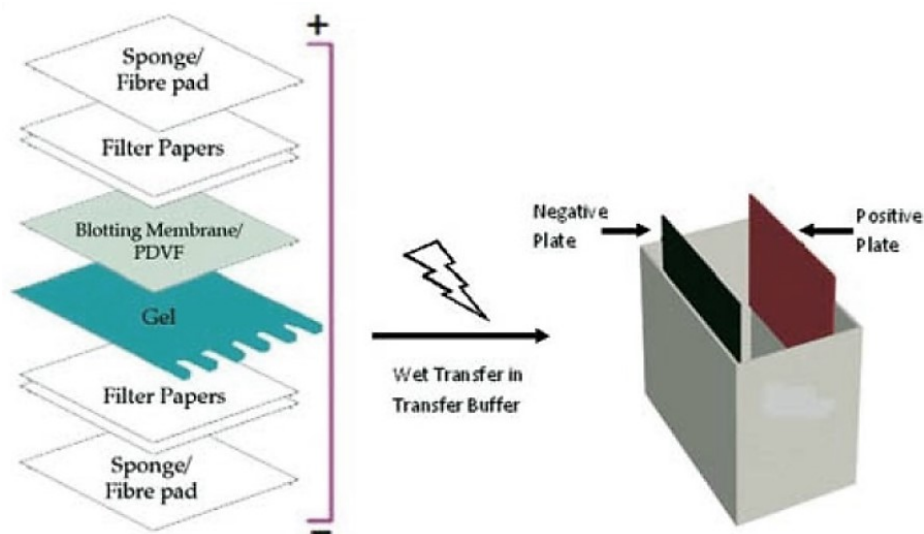
První krok nazýváme příprava vzorku. Jedná se o nejdůležitější část celé metody. Provádíme zde extrakci proteinů za pomoci pufrů, které vybíráme podle charakteru cílového proteinu (70). Jelikož vzorky vykazují vyšší struktury, je třeba provést homogenizaci. Proces se provádí za nízké teploty (4 °C) s použitím inhibitorů proteáz, abychom předešli možné denaturaci. Po provedení extrakce je třeba určit koncentraci proteinů pro změření jejich hmotnosti. Následně nanášíme další pufr s obsahem barviva pro zviditelnění vzorku a provádíme denaturaci za použití vyšší teploty (71).

Následuje separace za pomoci polyakrylamidového gelu, která je známá jako diskontinuální gelová elektroforéza. Princip spočívá v rozdílné molekulové hmotnosti proteinů a velikosti pórů gelu (70) (72). Vlivem předešlé denaturace vykazují proteiny negativní náboj a přechází ke kladné elektrodě. Zde jsou užity dva typy agarového gelu – stohovací gel

a separační neboli rozlišovací gel. Separační gel o pH 8,8 má vyšší obsah polyakrylamidu. Vytváří úzké póry, díky kterým umožňuje rychlejší pohyb menších molekul a brání pohybu větších molekul. Stohovací gel o pH 6,8 má naopak nižší obsah polyakrylamidu. Umožňuje tvorbu tenkých a ostře ohraničených proužků (70) (71).

V dalším kroku přenášíme elektroforeticky již separované proteiny na membránu (70). Přenos provádíme vytvořením tzv. přenosového sendviče. Na obou koncích sendviče je umístěna vláknitá podložka s filtračním papírem. Mezi nimi je umístěna v těsném kontaktu membrána s gelem. Membrána se musí nacházet mezi povrchem gelu a kladnou elektrodou. Schéma přenosného sendviče je znázorněno na Obr. 12. Za pomoci elektrického proudu se záporně nabitě proteiny přenesou z gelu na membránu. V praxi se používají dva typy membrány: nitrocelulózoová a z polyvinylidenfluoridu (PVDF). Nitrocelulózoová membrána má vysokou afinitu k proteinům. Je však křehká, z toho důvodu ji lze použít jednorázově. Pro opakovanou aplikaci se používá mechanicky odolnější PVDF membrána (71).

Obrázek 12. Schéma přenosného sendviče (71)



Gel: gelová vrstva; Blotting membrane/PDVF: membrána PDVF; Filter papers: filtrační papíry; Sponge/Fibre pad: vláknitá podložka; Wet transfer in transfer buffer: přenos „mokrou cestou“; Negative plate: negativní elektroda; Positive plate: pozitivní elektroda

Velmi důležitým krokem je „blokování“ (Blocking). Bráníme tím tvorbě nespecifických vazeb protilátek. Blokování se provádí většinou pomocí odtučněného sušeného mléka, hovězího sérového albuminu nebo blokovacích pufrů (70) (71).

Po blokování membrána interaguje s primárními a sekundárními protilátkami. Primární protilátka se váže na sledovaný protein. Poté je třeba provést promytí v promývacím pufru k odstranění nenavázané protilátky. Následuje inkubace sekundární protilátky, tzv. reportérového enzymu na primární protilátky. Obvykle protilátku zastupuje enzym jako křenová peroxidáza a alkalická fosfatáza (70) (71).

Jako poslední je třeba provést detekci. Existuje několik možností provedení: použití radiotického izotopu, kolorimetrická detekce a chemiluminiscenční detekce. Výběr metody závisí především na výběru sekundární protilátky (70) (72).

Přestože se jedná o metodu jednoduchou, mohou se objevit chyby znemožňující získat správný a spolehlivý výsledek. Z toho důvodu je třeba těmto chybám předcházet a minimalizovat je. Nejčastější chyby vyplývají ze špatné koncentrace proteinů a protilátek. Typickou chybou je např. vysoké pozadí, žádné zobrazení pásů, výskyt neobvyklých pásů a slabý signál. Vysoké pozadí bývá zapříčiněno vysokou koncentrací protilátky. Naopak slabé signály poukazují na nedostatečnou koncentraci protilátek. Obdobně platí také pro případ, kdy se neobjeví žádné pásy. Neobvyklé pásy mohou vzniknout v důsledku degradace proteáz, příliš vysokého napětí, nadměrného množství bílkovin nebo z důvodu přítomnosti vzduchových bublin (70) (71) (72).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodika

Experimentální část spočívala v laboratorním měření exprese lidského Eng a sledovaných biomarkerů (VCAM-1, ICAM-1, Mac-2) na experimentálních modelech (pokusných zvířatech). Metodou ke stanovení exprese sledovaných molekul byla western blot analýza. Postup dle western blot analýzy byl pro každou sledovanou látku proveden čtyřikrát. Dvakrát pro sledované molekuly a dvakrát s kontrolním proteinem. Jako kontrolní protein jsme použili Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Gapdh). Výstupem této metody byly změřené hodnoty, které byly následně statisticky analyzovány.

4.2 Chemikálie

K provedení experimentu jsme použili chemikálie od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Bio-Rad Laboratories (Herkules, CA, USA). Pro naše účely byla také použita voda čištěná za pomoci systému Milli-Q (Schwalbach, Německo).

4.3 Pokusná zvířata – experimentální model

K provedení experimentu jsme použili 10 týdnů staré transgenní (geneticky modifikované) myši kmene CBAxC57BL/6J exprimující lidský L-endoglin (L-Eng⁺) a jejich sourozence bez genetické modifikace (WT). Tato pokusná zvířata jsme si rozdělili do tří skupin. První skupinou WT_{CHOW} („bez diety a bez exprese Eng“) byly myši WT (n=6), krmené po dobu 8 týdnů běžnou potravou. Druhá skupina WT_{CDAA-HFD} („s dietou a bez exprese Eng“) představovala myši WT (n=6), krmené po dobu 8 týdnů kombinovanou dietou, která se skládala z CDAA a HFD (CDAA-HFD). Třetí skupinu L-Eng⁺_{CDAA-HFD} („s dietou a expresí Eng“) tvořily transgenní myši (n=6) krmené dietou CDAA-HFD po dobu 8 týdnů. Plemeno WT pochází z našeho zařízení, transgenní myši byly vytvořeny na univerzitě v Salamance ve Španělsku.

Po uplynutí 8 týdnů byla zvířata usmrcená. Pro analýzu byly odebrány vzorky jaterní tkáně a okamžitě zmrazeny tekutým dusíkem na teplotu -80°C. S pokusnými zvířaty bylo zacházeno v souladu s etickými pokyny stanovenými Etickou komisí Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Veškeré provedené experimenty byly provedeny podle zákona č. 246/1992 Sb.

4.4 Western blot analýza

4.4.1 Příprava vzorku

4.4.1.1 Příprava gelu

Jako první byly připraveny dva druhy gelu: 10% rozdělovací gel a 5% stohovací gel. Chemikálie použité k přípravě obou gelů jsou uvedeny v Tab. 1 a v Tab. 2.

Tabulka 1. Rozdělovací gel 10%

Materiál	Množství
Milli-Q voda	4,900 ml
Rozlišovací gelový pufr	2,500 ml
Roztok bis-akrylamidu	2,500 ml
10 % SDS (Dodecylsulfát sodný)	0,100 ml
10 % APS (Persíran amonný)	0,030 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	0,015 ml

Tabulka 2. Stohovací gel 5%

Materiál	Množství
Milli-Q voda	6,150 ml
Zaostřovací gelový pufr	2,500 ml
Roztok bis-akrylamidu	1,250 ml
10 % SDS (Dodecylsulfát sodný)	0,100 ml
10 % APS (Persíran amonný)	0,030 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	0,015 ml

Dále bylo třeba sestavit aparaturu z tlustého sklíčka, tenkého sklíčka a stojanu. Abychom zabránili možnému nechtěnému úniku gelu z aparatury, ještě před použitím gelu jsme provedli kontrolu těsnění za použití vody. Do otvoru mezi sklíčky jsme nanесли rozdělovací gel tak, aby zaplnil většinu prostoru do výše 1 cm od kraje. Na něj jsme do zbylé části umístili vrstvu isobutanolu. Tento roztok zajistil neprůchodnost vzduchu. Gel jsme nechali 30 až 60 minut polymerizovat.

Poté jsme isobutanolovou vrstvu odstranili, uvolněnou část prostoru opláchli vodou a nanесли stohovací gel. Do roztoku jsme vložili teflonový hřeben k vytvoření patnácti gelových komůrek. Nechali jsme gel polymerizovat. Po uplynutí 30 až 60 minut jsme opatrně hřeben vytáhli.

4.4.1.2 Příprava samotných vzorků

Připravili jsme si několik vzorků. Za laboratorní teploty jsme nechali rozmrazit vzorky z myších tkání: 3 vzorky z myší krmených běžnou stravou, 3 vzorky z myší krmených dietou CDAA-HFD, 3 vzorky z myší s upraveným genotypem. Dále jsme si připravili vzorky s obsahem vody a mPAGE Color Protein Standard, který obsahoval proteiny s chromofory pro vizualizaci metody. Všechny vzorky jsme smísili s nanášecím pufrem „sample buffer“ (S3401, Sigma Aldrich, MO, USA) v poměru 1:1 (6μl vzorek a 6μl pufru). Do každé připravené gelové komůrky jsme aplikovali 10 μl připraveného vzorku.

4.4.2 Elektroforéza

Skříčka s připraveným gelem jsme vložili do přístroje určeného k elektroforéze. Připravené vzorky jsme aplikovali do gelových jamek. Přístroj byl naplněn SDS elektroforetickým pufrem (tzv. „running buffer“) a případně vzniklé bubliny byly odstraněny. Tento pufr (Tris/glycine/SDS, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) byl pro naše účely 10x zředěn. Přístroj jsme uzavřeli a připojili k elektrickému zdroji. Separace probíhala při napětí 200 V a za konstantního elektrického proudu 30 mA přibližně 1 h a 20 minut. Přístroj byl z obou stran chlazen ledem.

4.4.3 Přenos na membránu

Po ukončení separace následoval přenos proteinů na membránu tzv „mokrou cestou“. Za tímto účelem jsme si připravili pufr pro transfer. Jednotlivé složky pufru jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 3. Pufr pro transfer

Materiál	Množství
Pufr pro transfer	100 ml
Milli-Q voda	700 ml
Methanol	200 ml

Aby mohlo k přenosu dojít, bylo třeba provést aktivaci membrány. Membránu jsme ponořili na 30 sekund do methanolu a následně na 25 minut do pufru pro transfer. Mezitím jsme vyjmuli z přístroje gelovou vrstvu se separovanými proteiny, odstranili jamky a umístili gelovou vrstvu do roztoku pufru.

Přenos z gelu na membránu jsme provedli způsobem tzv. „mokrý cesta“. Tento způsob je založený na ponoření veškerých komponentů do pufru, jejich skládáním do tzv. sendviče a vložením do přístroje. Každá složka se přejela válečkem, aby byly odstraněny veškeré přítomné bubliny. Samotný přenos trval 1h 30 minut za elektrického proudu 300 mA a při napětí 100 V.

4.4.4 Blokování

Před provedením inkubace protilátek bylo třeba zamezit tvorbě nespecifických vazeb, které by mohly znehodnotit výsledky. Nejprve jsme si připravili TBS-T roztok za použití Tris pufrovaného fyziologického roztoku (TBS), vody a Tween20 dle Tab. 4.

Tabulka 4. Roztok TBS-T

Materiál	Množství
TBS	200 ml
Milli-Q voda	1800 ml
Tween20	2,00 ml

Membrány jsme obarvili a poté ponořili do TBS-T. Membrány jsme rozstříhali na několik proužků podle molekulové hmotnosti sledovaného proteinu.

Dále jsme si připravili 5 % mléko obsahující 95 ml TBS-T a 5 g odtučněného mléka. Do takového roztoku jsme na 1 h ponořili proužky membrán. Během té doby proběhlo blokování nespecifických vazeb.

4.4.5 Inkubace protilátek

Po uplynutí vyměřeného času došlo k inkubaci primárními a sekundárními protilátkami. Obě skupiny jsme zředili s 5 % mlékem v příslušné koncentraci. Jako první jsme aplikovali roztok primárních protilátek na proužky membrán a nechali inkubovat přes noc v lednici. Následující den jsme membrány promyli a provedli nános roztoku sekundárních protilátek. Protilátky jsme nechali inkubovat 1 h. Poté jsme membránu opět promyli.

4.4.6 Detekce

V posledním kroku proběhla detekce. Za tímto účelem byl použit detekční roztok Immobilon Forte western HRP substrát (WBLUF0020, Merck, NJ, USA). Chemiluminiscence byla provedena na zařízení ChemiDoc.

4.5 Statistická analýza dat

Pro statistické vyhodnocení dat získaných pomocí western blot analýzy jsme použili software GraphPad Prism 9.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Metodou pro vyhodnocení byl neparametrický Mann-Whitney test.

Mann-Whitney test se používá pro porovnání dvou nezávislých skupin vzorků obvykle o malé velikosti (množství hodnot $n < 30$) a které nemají normální rozložení hodnot. Účelem je otestovat hypotézu, zda rozdělení hodnot obou skupin vzorků je stejné. Součástí této metody je tzv. nulová a alternativní hypotéza. Nulová hypotéza předpokládá stejné rozdělení hodnot v obou skupinách. Alternativní hypotéza předpokládá, že rozdělení hodnot v obou skupinách vzorků nejsou stejná.

Kritériem pro vyhodnocení je tzv. „P-hodnota“ u které rozlišujeme následující možnosti:

- $**p < 0,01$: statisticky vysoce významné
- $*p < 0,05$: statisticky významné
- $ns\ p > 0,05$: statisticky nevýznamné

5. VÝSLEDKY

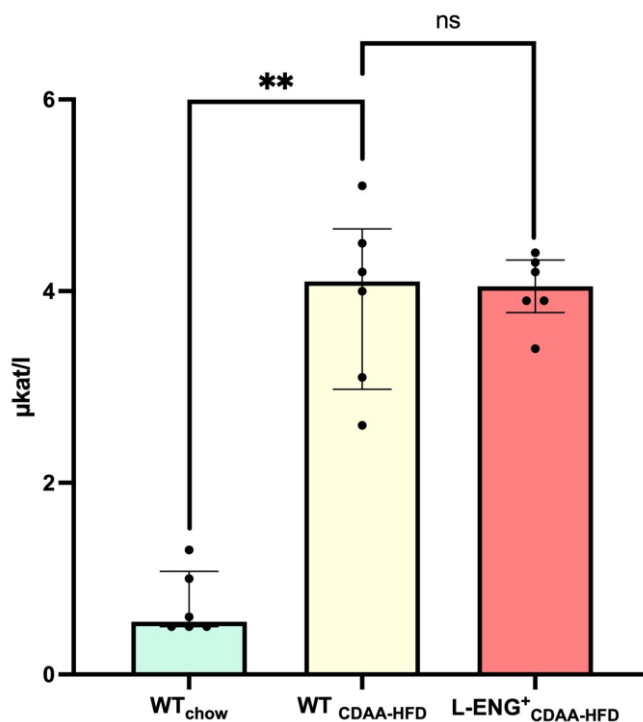
5.1 Ověření experimentálního modelu

Před analýzou sledovaných biomarkerů bylo třeba ověřit vhodnost použití experimentálního zvířecího modelu. Šlo o ověření předpokladu, že vzorky skupin potvrzující přítomnost jaterního onemocnění $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ vykazují odlišnost od modelu WT_{chow} , a že vzorky geneticky upraveného modelu se při dietě CDAA-HFD významně neliší od vzorků $WT_{CDAA-HFD}$.

5.1.1 Aktivita AST v plazmě

Výsledky aktivity AST v plazmě zobrazuje Graf 1. Signifikantně zvýšená aktivita AST potvrzuje indukci jaterního onemocnění MASH způsobené dietou CDAA-HFD. Naproti tomu mezi skupinami $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ není statisticky významný rozdíl v aktivitě AST.

Graf 1. Aktivita AST v plazmě



Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} – „wild-type“ myši krmené standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD;

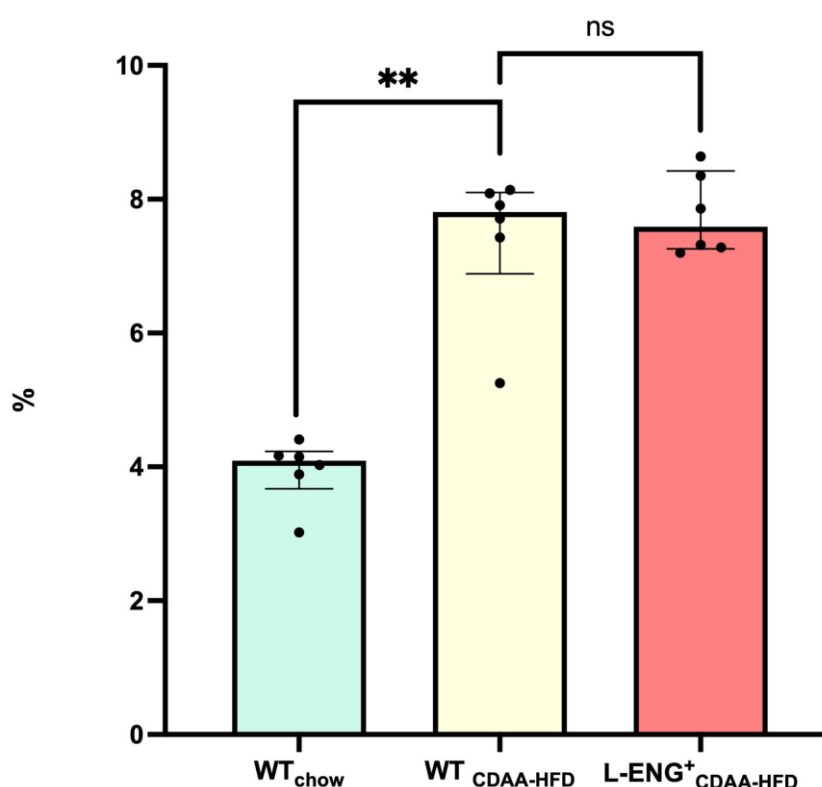
Osa y – aktivita AST v plazmě [μkat/l]

Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney test

5.1.2 Poměr hmotnosti jater vůči tělesné hmotnosti myších modelů

Graf 2. zobrazuje změnu poměrů hmotností jater jednotlivých pokusných zvířat v porovnání s celkovou tělesnou hmotností těchto zvířat. Zaznamenali jsme nárůst poměru u skupin krmených dietou CDAA-HFD oproti skupině WT_{chow} o více jak 3 %. Je zřejmé, že dieta CDAA-HFD způsobila nárůst hmotnosti jater typické pro onemocnění MAFLD/MASH. Na druhou stranu z grafu je patrné, že rozdíl v uvedeném poměru mezi $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^+_{CDAA-HFD}$ je vyhodnocen jako statisticky nevýznamný.

Graf 2. Poměr hmotnosti jater vůči tělesné hmotnosti



Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} – „wild-type“ myši krmených standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-Eng^+_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD;

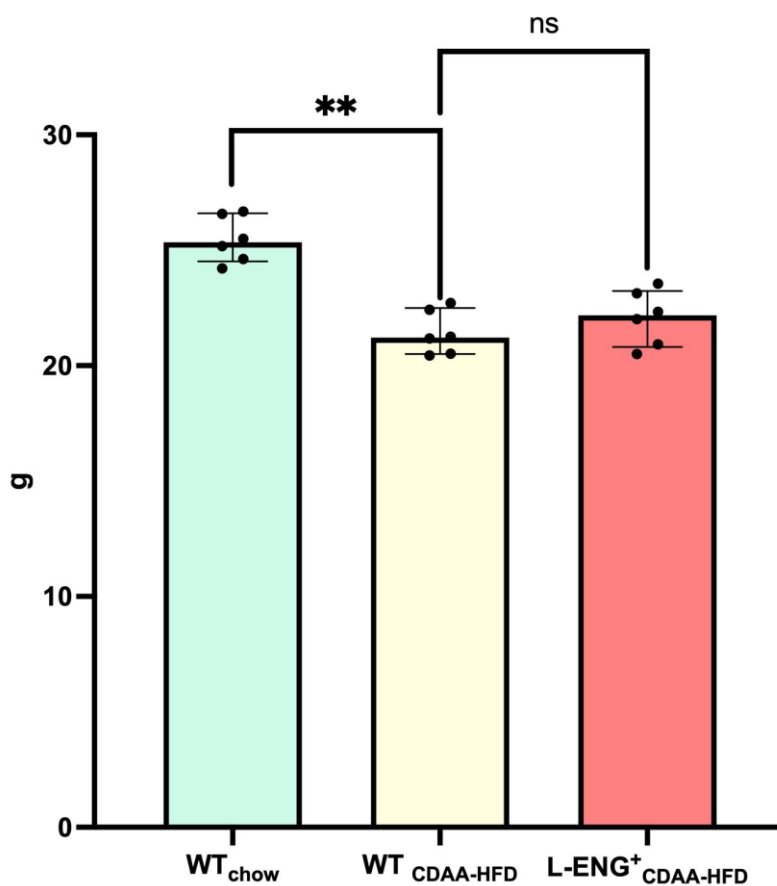
Osa y – poměr hmotnosti jater k celkové tělesné hmotnosti myších modelů [%]

Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney test

5.1.3 Váha pokusných zvířat

Graf 3. zobrazuje změnu hmotnosti pokusných zvířat v důsledku aplikované diety. První skupina WT_{chow} představovala váhu jater za běžného zdravotního stavu. U dalších dvou skupin je patrný pokles tělesné váhy. Je zřejmé, že dieta CDAA-HFD způsobila statisticky významný pokles hmotnosti pokusných zvířat obdobně jako při onemocnění MAFLD/MASH. Rozdíl v hmotnosti mezi $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ je vyhodnocen jako statisticky nevýznamný.

Graf 3. Váha pokusných zvířat



Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} – „wild-type“ myši krměných standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krměné kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krměné kombinovanou dietou CDAA-HFD;

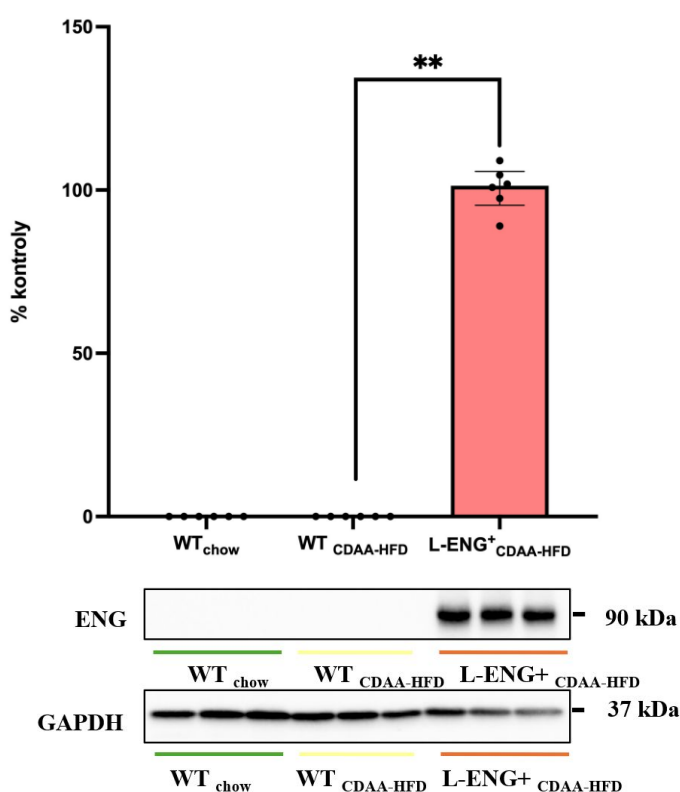
Osa y – celková tělesná hmotnost myších modelů [g]

Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney test

5.1.4 Exprese lidského endoglinu

Graf 4. zobrazuje expresi lidského Eng v játrech pozorovaných myší. Pro stanovení exprese Eng v játrech pokusných zvířat byla použita metoda western blot analýzy. Modely WT_{chow} a WT_{CDAA-HFD} nevykazují žádnou expresi lidského Eng. Naopak u vzorků skupiny geneticky modifikovaných myší krmených dietou CDAA-HFD výsledky potvrzují statisticky významnou expresi lidského Eng potřebnou pro ověření vlivu exprese Eng na expresi sledovaných biomarkerů.

Graf 4. Exprese lidského Endoglinu v játrech



Osa x – měřené skupiny: **WT_{chow}** – „wild-type“ myši krmených standardní stravou po dobu 6 týdnů; **WT_{CDAA-HFD}** – WT myši krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD; **L-Eng⁺ CDAA-HFD** – myši exprimující lidský sEng a krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD;

Osa y – indikuje expresi sledovaného proteinu (Eng) jako „% kontroly“ [%]

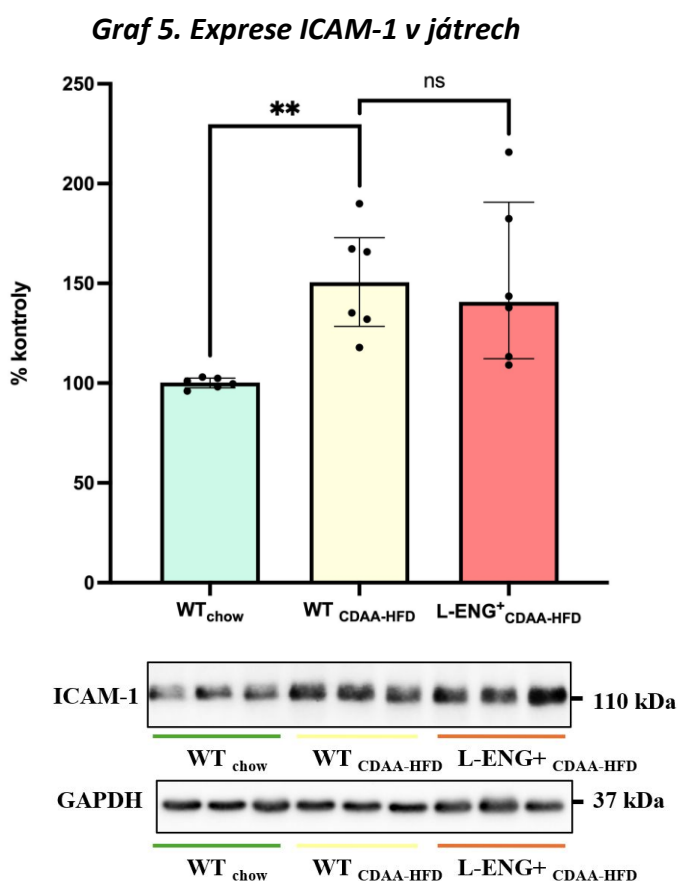
Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns p>0,05; **p<0,01; Mann-Whitney test

5.2 Exprese proteinů zaměřených na zánět

Pro stanovení exprese sledovaných proteinů ICAM-1, VCAM-1 a Mac-2 v myších játrech byla použita metoda western blot analýza. Pro potřeby statistického vyhodnocení vlivu exprese Eng na expresi sledovaného biomarkeru (pro porovnání skupin $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-ENG^{+}_{CDAA-HFD}$) byl použit Mann-Whitney test. Pomocí neparametrického Mann-Whitney testu bylo posouzeno, zda se obě sledované skupiny navzájem statisticky liší.

5.2.1 Exprese ICAM-1

Graf 5. zobrazuje expresi proteinu ICAM-1 v játrech sledovaných skupin vzorků.



Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} - „wild-type“ myši krmených standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-ENG^{+}_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD;

Osa y – indikuje expresi sledovaného proteinu (ICAM-1) jako „% kontroly“ [%]

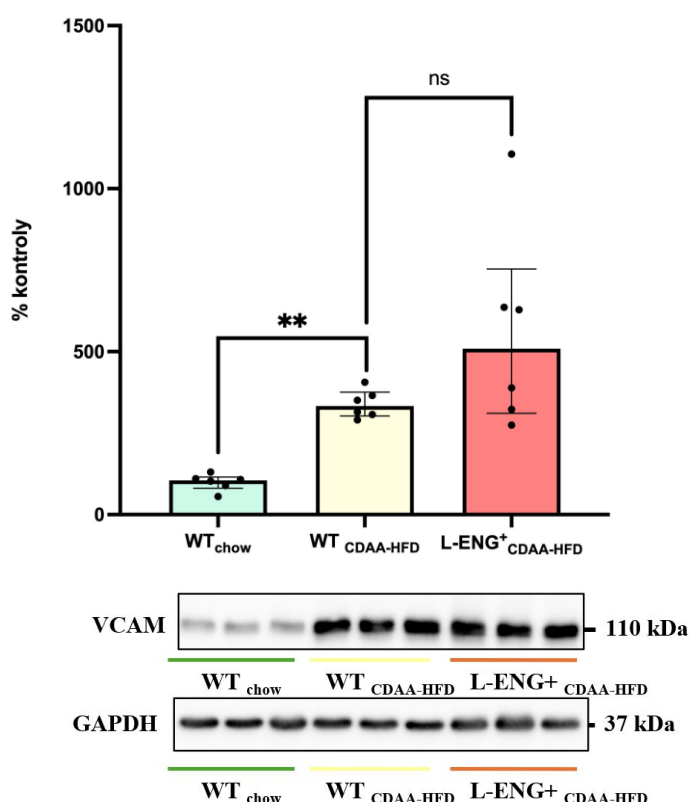
Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney test

Obě skupiny s dietou CDAA-HFD vykazují nárůst cca 40-50 % oproti skupině bez diety (WT_{chow}), což poukazuje na zvýšení zánětu po podávání CDAA-HFD diety. Naopak výsledek porovnání expresí $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ je „ns $p>0,05$ “, což pokazuje na fakt, že overexprese Eng nevedla k signifikantnímu ovlivnění exprese ICAM-1.

5.2.2 Exprese VCAM-1

Expresi proteinu VCAM-1 v játrech sledovaných vzorků nám zobrazuje Graf 6. Exprese sledovaného proteinu vykazovala nárůst hladiny u skupin $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ v porovnání se skupinou WT_{chow} , což poukazuje na zvýšení zánětu po podávání CDAA-HFD diety. Naopak, výsledek porovnání expresí $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ je „ns $p>0,05$ “, což pokazuje na fakt, že overexprese Eng nevedla k signifikantnímu ovlivnění exprese VCAM-1.

Graf 6. Exprese VCAM-1 v játrech



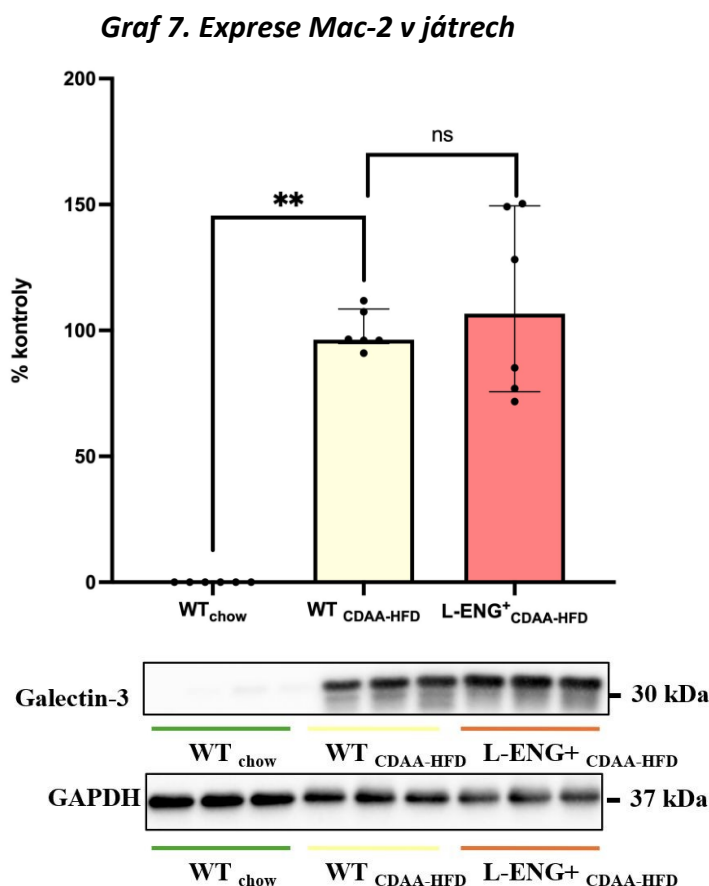
Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} - „wild-type“ myši krměných standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krměné kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krměné kombinovanou dietou CDAA-HFD;

Osa y – indikuje expresi sledovaného proteinu (VCAM-1) jako „% kontroly“ [%]

Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p>0,05$; ** $p<0,01$; Mann-Whitney test

5.2.3 Expres Mac-2

Expres proteinu Mac-2 (Galectin-3) v játrech sledovaných zvířecích modelů je zobrazena v Grafu 7. Je patrný statisticky významný nárůst Mac-2 u skupin $WT_{CDAA-HFD}$ a WT_{chow} . To poukazuje na zvýšení zánětu po podávání CDAA-HFD diety. Výsledek porovnání expresí $WT_{CDAA-HFD}$ a $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ je „ns $p>0,05$ “. To znamená, že overexpres Eng nevedla k signifikantnímu ovlivnění exprese Mac-2.



Osa x – měřené skupiny: WT_{chow} - „wild-type“ myši krmených standardní stravou po dobu 6 týdnů; $WT_{CDAA-HFD}$ – WT myši krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD; $L-Eng^{+}_{CDAA-HFD}$ – myši exprimující lidský sEng a krmené kombinovanou dietou CDAA-HFD;

Osa y – indikuje expresi sledovaného proteinu (Mac-2) jako „% kontroly“ [%]

Údaje jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozpětím; ns $p>0,05$; ** $p<0,01$; Mann-Whitney test

6. DISKUSE

Endoglin je 180kDa transmembránový glykoprotein, označovaný jako ligandový koreceptor nadrodiny transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β). Existuje ve dvou formách: membránový endoglin (Eng) a solubilní endoglin (sEng). Expresi membránového endoglinu zajišťují především endotelové buňky (51), jaterní sinusové endoteliální buňky (LSEC) (53), fibroblasty (73), jaterní hvězdčité buňky (HSC) (63), aktivované monocyty a makrofágy (54). Naopak Eng není exprimován jaterními hepatocyty (59) (64).

Eng hraje důležitou roli při rozvoji fibrózy v játrech. Meuer a kol. zaznamenali vysokou expresi Eng v izolovaných HSC, v buňkách podobných myofibroblastům, v jaterních makrofázích (Kupfferovy buňky) a v LSEC (64). Zvýšená exprese Eng byla také pozorována během aktivace HSC a jejich transdiferenciace na buňky podobné myofibroblastům v buněčné kultuře a také v experimentálních modelech poškozených jater u myší a potkanů (Tetrachlormethan, CCl_4) (59). Jak se prokázalo, Eng může ovlivnit signalizaci SMAD 2/3 a SMAD 1/5 při různých experimentálních nebo patologických podmínkách v játrech (65) (66). Na druhou stranu Alsamman a kol. poukázali na ochrannou funkci Eng proti fibrotickému poškození jater. Zjistili, že nedostatek Eng významně zhoršuje jaterní fibrózu v reakci na poškození jater vyvolané modulací signalizace TGF- β /SMAD (68). Nedávné výsledky ukázaly, že Eng není exprimován pouze jaterními hvězdčovitými buňkami a myofibroblasty v játrech, ale také v sinusových endotelových buňkách během vývoje MASH, což naznačuje jeho potenciální roli při aktivaci či zánětu endotelu (67). Stále však není jasně definováno, zda Eng stimuluje nebo inhibuje fibrózu a dysfunkci jaterních sinusoid v játrech a zda ovlivňuje vývoj MASH.

Zánět jater zahrnuje transmigraci leukocytů. Tento dobře organizovaný vícekrokový proces v sobě zahrnuje přesun leukocytů na endotel, aktivaci leukocytárních integrinů, vytvoření pevné adheze ke stěně endotelu, intravaskulární přechod přes endotel a nakonec transmigraci do tkáně. VCAM-1 a ICAM-1 jsou vysoce exprimovány v zánětlivých LSEC a jsou nezbytné pro transmigraci leukocytů do zánětlivé jaterní tkáně (32). Ukázalo se, že jak VCAM-1, tak ICAM-1 se podílejí na rozvoji sinusoidního endoteliálního zánětu jater. VCAM-1 byl identifikován jako mediátor adheze monocytů k LSEC. Prokázalo se, že VCAM-1 podporuje kapilarizaci během poškození jater a vykazuje profibrogenní roli při jaterní fibróze (36). Dále bylo uvedeno, že VCAM-1 je převážně exprimován pomocí LSEC (53). Prostřednictvím LSEC je také silně exprimován ICAM-1 (53). Zjistilo se, že blokování ICAM-1 v LSEC snižuje adhezi

a transmigraci nádorových buněk prostřednictvím LSEC jak *in vitro*, tak *in vivo* (39). Zároveň se ukázalo, že Eng se podílí na adhezi a transmigraci leukocytů během zánětu prostřednictvím své interakce alespoň s aktivovaným integrinem $\alpha 5\beta 1$ (55).

V této diplomové práci jsme použili geneticky modifikované myši kmene CBAx57BL/6J, které jsou schopné overexpresy lidského endoglinu. Tyto myši mají zvýšenou expresi lidského endoglinu v játrech a dalších orgánech (28). Přestože bylo prokázáno, že nadměrná exprese Eng je spojena s renální fibrózou (28), zatím neexistují žádné studie zkoumající vliv Eng na rozvoj zánětu a MASH.

V této práci jsme se zaměřili na zhodnocení vlivu overexpresy Eng v játrech na expresi biomarkerů jaterní sinusoidální endotelové dysfunkce s ohledem na rozvoj zánětu a MASH.

Použili jsme dietu CDAA-HFD složenou z cholin-deficientní, aminokyselinově definované diety a vysokotučné diety. Tato dieta byla aplikována po dobu 8 týdnů k indukci MASH (30). Dieta významně zvýšila aktivitu jaterního enzymu AST a expresi adhezních molekul (VCAM-1 a ICAM-1) a markeru makrofágů (Mac-2), což naznačuje úspěšnou indukci zánětu LSEC a MASH u těchto myší.

Na druhou stranu, u myší schopných exprese lidského endoglinu nebyly zjištěny žádné signifikantní změny aktivity AST a exprese VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2. To naznačuje, že nadměrná exprese Eng neovlivňuje progresi MASH ani progresi zánětu. Jak bylo uvedeno výše, overexprese Eng podporovala progresi fibrózy v ledvinách. Tato skutečnost ukazuje na potenciální profibrotický účinek Eng. V této práci jsme se však zaměřili na zánětlivé biomarkery.

Nepodařilo se nám prokázat významný dopad nadměrné exprese Eng na sledované biomarkery. Nemůžeme vyloučit, že 8 týdnů CDAA-HFD diety není dostatečně dlouhá doba na to, aby se projevil potenciální dopad nadměrné exprese Eng. Proto navrhuje různé experimentální přístupy a diety, jako je např. dieta FFC (Fructose–Fat–Cholesterol Diet), která se obvykle používá po dobu 6 měsíců a vede k rozvoji pokročilejšího MASH (74).

7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověření hypotézy, zda overexprese endoglinu při výskytu zmíněných onemocnění má významný dopad na změny exprese markeru pro detekci makrofágů ve tkáních (Mac-2) a na změny exprese adhezních molekul (VCAM-1 a ICAM-1).

Pro určení exprese endoglinu a sledovaných proteinů byla použita metoda western blot analýza. Exprese lidského endoglinu a proteinů VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 byla sledována na játrech ve třech skupinách zvířecích modelů. Součástí experimentu bylo vedle určení exprese uvedených molekul rovněž ověření experimentálního modelu. K navození MASH byla podávána dieta CDAA-HDF u dvou skupin zvířecích modelů. To bylo potvrzeno zvýšením aktivity AST a zvýšením exprese VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2 v játrech těchto zvířecích modelů ve srovnání se skupinou, která byla krmena standardní stravou.

V játrech skupiny zvířecích modelů krmených dietou CDAA-HFD a se schopností exprese lidského endoglinu nedošlo k výraznému ovlivnění exprese VCAM-1, ICAM-1 ani Mac-2 oproti skupině s dietou CDAA-HFD a bez schopnosti exprese Eng.

Podání diety CDAA-HFD vedlo k navození stavu MASH, ale overexprese lidského endoglinu významně neovlivnila expresi VCAM-1, ICAM-1 a Mac-2.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam	Český význam
ALK	Activin receptor-like kinase	Kináza podobná aktivinovému receptoru
ALT	Alanine aminotransferase	Alaninaminotransferáza
APS	Ammonium persulphate	Persíran amonný
AST	Aspartate aminotransferase	Aspartátaminotransferáza
BMP	Bone Morphogenetic Factor	Kostní morfogenetický protein
CCl ₄	Carbon tetrachloride	Tetrachlormethan
CD105	Endoglin	Endoglin
CDAA	Choline-deficient L-amino-defined diet	Cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná dieta
CDAA-HFD	Combination of Choline-deficient L-amino-defined diet and High fat diet	Kombinace cholin-deficitní a L-aminokyselinami definované diety a diety s vysokým obsahem tuku
DAMP	Damage-associated molecular pattern	Molekulární vzory spojené s poškozením
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
Eng	Endoglin	Endoglin
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ET-1	Endothelin1	Endotelin 1
FFC	Fructose–Fat–Cholesterol Diet	Dieta s vysokým obsahem tuku, fruktózy a cholesterolu
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HFD	High fat diet	Dieta s vysokým obsahem tuku
HHT	Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia	Dědičná hemoragická teleangiektázie
HSC	Hepatic stellate cells	Jaterní hvězdčovitá buňka
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Intracelulární adhesivní molekula-1
IL-1 β	Interleukin-1	Interleukin 1

IL-6	Interleukin-6	Interleukin 6
LDL	Low-density lipoproteins	Lipoproteiny s nízkou hustotou
L-eng	Long endoglin	L-endoglin
L-Eng ⁺ _{CDAH-HFD}	Mice expressing human L-endoglin with CDAH-HFD diet	Myši exprimující lidský L-endoglin a s dietou CDAH-HFD
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells	Jaterní sinusové endoteliální buňky
Mac-2	Galectin-3	Galectin-3
MAFLD	Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease	Ztukovatění jater spojené s metabolickou dysfunkcí
MASH	Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis	Steatohepatitida spojená s metabolickou dysfunkcí
MCD	Methionine-choline deficient diet	Dieta s nedostatkem methioninu a cholinu
MMP	Matrix Metalloproteinase	Matricová metaloproteáza
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Nealkoholická tuková jaterní choroba
NASH	Non-Alcoholic SteatoHepatitis	Nealkoholická steatohepatitida
NO	Nitric oxide	Oxid dusnatý
PVDF	Membrane from polyvinylidene difluoride	Membrána z polyvinylidenfluoridu
RDG	Arginyl-Glycyl-Aspartic Acid	Arginyl-glycyl-asparagová kyselina
ROS	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
SMAD	Small mothers against decapentaplegic	Intracelulární signální protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecylsulfát sodný
S-eng	Short endoglin	S-endoglin
sEng	Soluble endoglin	Rozpustný endoglin
TBS	Tris Buffered Saline	Tris pufovaný fyziologický roztok
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween	Tris pufovaný fyziologický roztok Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin

TGF- β	Transforming growth factor beta	Transformující růstový faktor- β
T β R-I	TGF- β Signaling Receptors type 1	TGF- β signální receptor typu 1
T β R-II	TGF- β Signaling Receptors type 2	TGF- β signální receptor typu 2
TNF- α	Tumor necrosis factor α	Tumor nekrotizující faktor- α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1	Vaskulární adhesivní molekula-1
VLDL	Very low density lipoproteins	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě
WT	„Wild type“ mice	Myši bez genetické modulace
WT _{CDAH-HFD}	„Wild type“ mice with CDAH-HFD diet	Myši bez genetické modulace a s dietou CDAH-HFD
WT _{chow}	„Wild type“ mice without CDAH-HFD diet	Myši bez genetické modulace a bez diety CDAH-HFD
ZP	Zona pellucida	Zóna pellucida

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Rozdělovací gel 10%.....	38
Tabulka 2. Stohovací gel 5%	38
Tabulka 3. Pufr pro transfer	40
Tabulka 4. Roztok TBS-T	40

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Anatomie jater, převzato a upraveno z (4)	11
Obrázek 2. Schéma hepatocytu a lalůčku, převzato a upraveno z (5)	12
Obrázek 3. Příčiny MAFLD a důsledek progresu onemocnění (10)	15
Obrázek 4. Schéma působení usmrčených hepatocytů na imunitní systém (25)	18
Obrázek 5. Schéma poškození LSEC (31)	21
Obrázek 6. Funkce VCAM-1 při rozvoji jaterní fibrózy (36)	23
Obrázek 7. Struktura membránového endoglinu, převzato a upraveno z (50).....	28
Obrázek 8. L-Eng a S-Eng, převzato a upraveno z (50)	28
Obrázek 9. Schéma vzniku sEng (51)	29
Obrázek 10. Schéma signalizace Endoglinu (38)	31
Obrázek 11. Schéma jednotlivých kroků western blot analýzy (70)	34
Obrázek 12. Schéma přenosného sendviče (71)	35

11. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Aktivita AST v plazmě	43
Graf 2. Poměr hmotnosti jater vůči tělesné hmotnosti	44
Graf 3. Váha pokusných zvířat.....	45
Graf 4. Expresce lidského Endoglinu v játrech	46
Graf 5. Expresce ICAM-1 v játrech	47
Graf 6. Expresce VCAM-1 v játrech	48
Graf 7. Expresce Mac-2 v játrech	49

12. POUŽITÁ LITERATURA

1. **R., Čihák.** *ANATOMIE 2.* 3. Praha : Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4788-0.
2. **SR, Abdel-Misih.** Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am.* [Online] Aug 2010. 90(4):643-653.
3. **Bureš J., Horáček J., Malý J. et al.** *Vnitřní lékařství.* Praha 5 : Galén, 2014. ISBN 978-80-7492-145-2.
4. **Petrošová K., Kaslová Z.** *Ilustrovaný atlas anatomie.* Říčany : Sun, 2013.
5. **L, Mescher A.** *Junqueriovy základy histologie.* Praha 5 : Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-324-1.
6. **I., Hulín.** *Patofyziologie.* Bratislava : ProLitera, 2020. ISBN 978-80-89668-07-6.
7. **Anaesth, Br J.** Clinical physiology of the liver. *Read AE.* [Online] Sep 1972. 44(9):910-917.
8. **Trefts E, Gannon M, Wasserman DH.** The liver. *Curr Biol.* [Online] 6. Nov 2017. 27(21):R1147-R1151.
9. **Sangro P, de la Torre Aláez M, Sangro B, D'Avola D.** Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): an update of the recent advances in pharmacological treatment. *J Physiol Biochem.* [Online] Nov 2023. 79(4):869-879.
10. **Ramírez-Mejía MM, Qi X, Abenavoli L, Romero-Gómez M, Eslam M, Méndez-Sánchez N.** Metabolic dysfunction: The silenced connection with fatty liver disease. *Ann Hepatol.* [Online] Nov-Dec 2023. 28(6):101138.
11. **Gofton C, Upendran Y, Zheng MH, George J.** MAFLD: How is it different from NAFLD? *Clin Mol Hepatol.* [Online] Feb 2023. 29(Suppl):S17-S31.
12. **Portincasa P, Khalil M, Mahdi L, Perniola V, Idone V, Graziani A, Baffy G, Di Ciaula A.** Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease: From Pathogenesis to Current Therapeutic Options. *Int J Mol Sci.* [Online] 22. May 2024. 25(11):5640.
13. **Boccatonda A, Andreetto L, D'Ardes D, Cocco G, Rossi I, Vicari S, Schiavone C, Cipollone F, Guagnano MT.** From NAFLD to MAFLD: Definition, Pathophysiological Basis and Cardiovascular Implications. *Biomedicines.* [Online] 13. Mar 2023. 11(3):883.
14. **Pipitone RM, Ciccioli C, Infantino G, La Mantia C, Parisi S, Tulone A, Pennisi G, Grimaudo S, Petta S.** MAFLD: a multisystem disease. *Ther Adv Endocrinol Metab.* [Online] 28. Jan 2023. 14:20420188221145549.
15. **Filipovic B, Marjanovic-Haljlji M, Mijac D, Lukic S, Kapor S, Kapor S, Starcevic A, Popovic D, Djokovic A.** Molecular Aspects of MAFLD-New Insights on Pathogenesis and Treatment. *Curr Issues Mol Biol.* [Online] 15. Nov 2023. 45(11):9132-9148.
16. **Machado MV, Diehl AM.** Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* [Online] Jun 2016. 150(8):1769-1777.
17. **Spengler EK, Loomba R.** Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin Proc.* [Online] Sep 2015. 90(9):1233-1246.

18. **CM, Sergi.** NAFLD (MASLD)/NASH (MASH): Does It Bother to Label at All? A Comprehensive Narrative Review. *Int J Mol Sci.* [Online] 2. Aug 2024. 25(15):8462.
19. **Pan C, Liu J, Gao Y, Yang M, Hu H, Liu C, Qian M, Yuan HY, Yang S, Zheng MH, Wang L.** Hepatocyte CHRNA4 mediates the MASH-promotive effects of immune cell-produced acetylcholine and smoking exposure in mice and humans. *Cell Metab.* [Online] 5. Dec 2023. 35(12):2231-2249.e7.
20. **Sandireddy R, Sakthivel S, Gupta P, Behari J, Tripathi M, Singh BK.** Systemic impacts of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) on heart, muscle, and kidney related diseases. *Front Cell Dev Biol.* [Online] 16. Jul 2024. 12:1433857.
21. **Wang S, Friedman SL.** Found in translation-Fibrosis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). *Sci Transl Med.* [Online] 4. Oct 2023. 15(716):eadi0759.
22. **Ganguly S, Rosenthal SB, Ishizuka K, Troutman TD, Rohm TV, Khader N, Aleman-Muench G, Sano Y, Archilei S, Soroosh P, Olefsky JM, Feldstein AE, Kisseleva T, Loomba R, Glass CK, Brenner DA, Dhar D.** Lipid-associated macrophages' promotion of fibrosis resolution during MASH regression requires TREM2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Online] 27. Aug 2024. 121(35):e2405746121.
23. **Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF.** Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* [Online] 3. Apr 2020. 9(4):875.
24. **Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G.** Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* [Online] Sep 2013. 59(3):583-94.
25. **Kubes P, Mehal WZ.** Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology.* [Online] Nov 2012. 143(5):1158-1172.
26. **de Carvalho Ribeiro M, Szabo G.** Role of the Inflammasome in Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* [Online] 24. Jan 2022. 17:345-365.
27. **Bataller R, Brenner DA.** Liver fibrosis. *J Clin Invest.* [Online] Feb 2005. 115(2):209-218.
28. **Oujo, B., Munoz-Felix, J. M., Arevalo, M., Nunez-Gomez, E., Perez-Roque, L., Pericacho, M., Gonzalez-Nunez, M., Langa, C., Martinez-Salgado, C., Perez-Barriocanal, F., Bernabeu, C. & Lopez-Novoa, J. M.** L-endoglin overexpression increses renal fibrosis after unilater ureteral obstruction. *PLoS One.* [Online] 2014. e110365.
29. **Lafoz E, Ruat M, Anton A, Oncins A, Hernández-Gea V.** The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration. *Cells.* [Online] 10. Apr 2020. 9(4):929.
30. **Eissazadeh S, Fikrova P, Rathouska JU, Nemeckova I, Tripska K, Vasinova M, Havelek R, Mohammadi S, Igreja Sa IC, Theuer C, König M, Micuda S, Nachtigal P.** Anti-Endoglin monoclonal antibody prevents the progression of liver sinusoidal endothelial inflammation and fibrosis in MASH. *Life Sci.* [Online] 1. Mar 2025. 364:123428.
31. **McConnell MJ, Kostallari E, Ibrahim SH, Iwakiri Y.** The evolving role of liver sinusoidal endothelial cells in liver health and disease. *Hepatology.* [Online] 1. Aug 2023. 78(2):649-669.
32. **Shetty, S., Lalor, P. F. & Adams, D. H.** Liver sinusoidal endothelial cells—gatekeepers of hepatic immunity. Nature reviews. *Gastroenterology & hepatology.* [Online] Sep 2018. 15(9):555-567.
33. **SH, Ibrahim.** Sinusoidal endotheliopathy in nonalcoholic steatohepatitis: therapeutic implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* [Online] 1. Jul 2021. 321(1):G67-G74.

34. **RM, Carr.** VCAM-1: closing the gap between lipotoxicity and endothelial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* [Online] 15. Mar 2021. 131(6):e147556.
35. **Ley K, Huo Y.** VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest.* [Online] May 2001. 107(10):1209-10.
36. **Guo Q, Furuta K, Islam S, Caporarello N, Kostallari E, Dielis K, Tschumperlin DJ, Hirsova P, Ibrahim SH.** Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis. [Online] 25. Aug 2022. 13:983255.
37. **Kang L, Kim M, Lee YM.** Expression of ICAM-1 in Blood Vascular Endothelium and Tissues in Human Premalignant Lesion and Gastric/Hepatocellular Carcinomas. *Korean J Gastroenterol.* [Online] 25. Apr 2022. 79(4):170-176.
38. **Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA.** ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology.* [Online] Mar 2003. 124(3):692-700.
39. **Benedicto A, Herrero A, Romayor I, Marquez J, Smedsrød B, Olaso E, Arteta B.** Liver sinusoidal endothelial cell ICAM-1 mediated tumor/endothelial crosstalk drives the development of liver metastasis by initiating inflammatory and angiogenic responses. *Sci Rep.* [Online] 11. Sep 2019. 9(1):13111.
40. **Kim DH, Sung M, Park MS, Sun EG, Yoon S, Yoo KH, Radhakrishnan K, Jung SY, Bae WK, Cho SH, Chung IJ.** Galectin 3-binding protein (LGALS3BP) depletion attenuates hepatic fibrosis by reducing transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) availability and inhibits hepatocarcinogenesis. *Cancer Commun (Lond).* [Online] Oct 2024. 44(10):1106-1129.
41. **Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, Arsenijevic N, Lukic ML.** Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* [Online] 28. Nov 2016. 22(44):9706-9717.
42. **Mackinnon AC, Tonev D, Jacoby B, Pinzani M, Slack RJ.** Galectin-3: therapeutic targeting in liver disease. *Expert Opin Ther Targets.* [Online] Jul-Dec 2023. 27(9):779-791.
43. **Vacca M, Kamzolas I, Harder LM, Oakley F, Trautwein C, Hatting M, Ross T, Bernardo B, Oldenburger A, Hjuler ST, Ksiazek I, Lindén D, Schuppan D, Rodriguez-Cuenca S, Tonini MM, Castañeda TR, Kannt A, Rodrigues CMP, Cockell S, Govaere O, Daly AK, Allison M.,** An unbiased ranking of murine dietary models based on their proximity to human metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Nat Metab.* [Online] Jun 2024. 6(6):1178-1196.
44. **Flessa CM, Nasiri-Ansari N, Kyrou I, Leca BM, Lianou M, Chatzigeorgiou A, Kaltsas G, Kassi E, Randeva HS.** Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *Int J Mol Sci.* [Online] 13. Dec 2022. 23(24):15791.
45. **Larter CZ, Yeh MM.** Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. [Online] Nov 2008. 23(11):1635-48.
46. **Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ.** Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflamm. *Dig Dis Sci.* [Online] May 2016. 61(5):1325-36.
47. **Kořínková L, Pražienková V, Černá L, Karnošová A, Železná B, Kuneš J, Maletínská L.** Pathophysiology of NAFLD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides. *Front Endocrinol (Lausanne).* [Online] 26. Nov 2020. 11:597583.

48. **Schoonderwoerd MJA, Goumans MTH, Hawinkels LJAC.** Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*. [Online] 12. Feb 2020. 10(2):289.
49. **LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS.** Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences*. [Online] 25. Dec 2020. 22(1):147.
50. **López-Novoa JM, Bernabeu C.** The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. [Online] Oct 2010. 299(4):H959-H974.
51. **Vicen, M., Igreja Sá, I.C., Tripská, K. et al.** Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cell. Mol. Life Sci*. [Online] Mar 2021. 78(6):2405-2418.
52. **Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP.** Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. [Online] 1. Sep 2006. 281(35):25110-25123.
53. **Eissazadeh S, Mohammadi S, Faradonbeh FA, Rathouska JU, Nemeckova I, Tripska K, Vitverova B, Dohnalkova E, Vasinova M, Fikrova P, Sa ICI, Micuda S, Nachtigal P.** Endoglin and soluble endoglin in liver sinusoidal endothelial dysfunction in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. [Online] Mar 2024. 1870(3):166990.
54. **Lastres, P., Bellon, T., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M. & Bernabeu, C.** Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*. [Online] Feb 1992. 22(2):393-397.
55. **Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, et al.** Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. [Online] 10. Jan 2013. 121(2):403-15.
56. **Gougos A, Letarte M.** Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. [Online] 25. May 1990. 265(15):8361-8364.
57. **Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C.** TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. [Online] Sep 2011. 121(6):233-251.
58. **Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C.** Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem*. [Online] 9. Aug 2002. 277(32):29197-29209.
59. **Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R.** Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cell signal*. [Online] Apr 2011. 23(4):683-699.
60. **Pawlak JB, Blobe GC.** TGF- β superfamily co-receptors in cancer. *Dev Dyn*. [Online] Jan 2022. 251(1):137-163.
61. **Vitverova B, Najmanova I, Vicen M, Tripska K, Sa ICI, Hyspler R, Pericacho M, Nachtigal P.** Long term effects of soluble endoglin and mild hypercholesterolemia in mice hearts. *PLoS One*. [Online] 29. May 2020. 15(5):e0233725.

62. **Garzon-Martinez M, Perretta-Tejedor N, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Gonzalez-Sarmiento R, Lopez-Hernandez FJ, Martinez-Salgado C.** Association of Alk1 and Endoglin Polymorphisms with Cardiovascular Damage. *Sci Rep*. [Online] 10. Jun 2020. 10(1):9383.
63. **Meurer, S., Wimmer, A. E., Leur, E. V. & Weiskirchen, R.** Endoglin Trafficking/Exosomal Targeting in Liver Cells Depends on N-Glycosylation. *Cells*. [Online] 28. Aug 2019. 8(9):997.
64. **Meurer, S. K., Alsamman, M., Scholten, D. & Weiskirchen, R.** Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World J Biol Chem*. [Online] 26. May 2014. 5(2):180-203.
65. **Munoz-Felix, J. M., Gonzalez-Nunez, M. & Lopez-Novoa, J. M.** ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*. [Online] Dec 2013. 24(6):523-537.
66. **Finnson KW, Philip A.** Endoglin in liver fibrosis. *J Cell Commun Signal*. [Online] Mar 2012. 6(1):1-4.
67. **Igreja Sá IC, Tripska K, Hroch M, Hyspler R, Ticha A, Lastuvkova H, Schreiberova J, Dolezelova E, Eissazadeh S, Vitverova B, Najmanova I, Vasinova M, Pericacho M, Micuda S, Nachtigal P.** Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver. *Int J Mol Sci*. [Online] 27. Nov 2020. 21(23):9021.
68. **Alsamman M, Sterzer V, Meurer SK, Sahin H, Schaeper U, Kuscuoglu D, Strnad P, Weiskirchen R, Trautwein C, Scholten D.** Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis-A protective factor against liver fibrosis. *Liver Int*. [Online] May 2018. 38(5):858-867.
69. **Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z.** Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ*. [Online] Jul 2021. 49(4):509-517.
70. **Begum H, Murugesan P, Tangutur AD.** Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*. [Online] Jun 2022. 73(1):58-69.
71. **Mahmood T, Yang PC.** Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. [Online] Sep 2012. 4(9):429-434.
72. **Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ.** An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. [Online] Jan 2017. 27(1):4-25.
73. **St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N. & Letarte, M.** Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*. [Online] Jun 1994. 134(6):2645-2657.
74. **Lastuvkova, H., Nova, Z., Hroch, M., Alaei Faradonbeh, F., Schreiberova, J., Mokry, J., Faistova, H., Stefela, A., Dusek, J., Kucera, O., Hyspler, R., Dohnalkova, E., Bayer, R. L., Hirsova, P., Pavek, P. & Micuda, S.** Carvedilol impairs bile acid homeostasis in mice: implication for nonalcoholic steatohepatitis. *Toxicol Sci*. [Online] 28. Nov 2023. 196(2):200-217.