

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Kateřina Nepomucká

**FUNKČNÍ ROLE HIF1 SIGNÁLNÍ DRÁHY V DIABETICKÉ
NEFROPATII**

Functional role of HIF1 regulated pathway in diabetic nephropathy

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele
Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a RNDr. Gabriely Pavlíkové, Ph.D.
a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze

Podpis:

Ráda bych poděkovala RNDr. Gabriele Pavlínkové za umožnění práce na tomto projektu. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc za cenné připomínky při psaní této práce. Velký dík patří i mé rodině všem, kteří mě podporovali při mém studiu a psaní této práce.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) remains the most common cause of end stage renal failure. Nearly 10% of patients with diabetes develop nephropathy. Hyperglycaemia in the kidneys leads to the activation of alternative metabolic pathways of glucose (glycation, activation of protein kinase C, and polyol pathway). These biochemical alterations lead to hypoxia and oxidative stress due to the increased formation of reactive oxygen species (ROS). Cellular response to hypoxia is controlled by hypoxia-induced factor 1 (HIF1), which is involved in the regulation of more than 800 genes. Target molecules of the HIF1 pathway participate in a wide range of physiological and pathological processes, e.g. angiogenesis, energy metabolism, apoptosis, migration, and proliferation. DN is associated with the pathological tissue remodelling process, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and inflammation. HIF1 regulates key molecules of these pathological processes. EMT is regulated by TGF β 1, CTGF, and SOX9. The progression of inflammation is regulated by VEGFA and AngII. The exact role of HIF1 signalling in the development of DN is not yet fully understood. This thesis evaluates the functional role of the HIF1 signalling pathway in the development of DN using a global heterozygous mutant with the deletion of the *Hif1 α* gene. Under diabetic conditions, the partial deletion of *Hif1 α* stimulated profibrotic and inflammatory processes in the kidneys. Expression of molecular activators of EMT (*Tgf β 1*, *Ctgf*, *Sox9*) was significantly affected by the combination of diabetic environment and mutation. Partial deletion of *Hif1 α* caused a high variability in the expression of *Vegfa*. Several *Hif1 α ^{+/-}* mutants had 10-fold higher or lower expression when compared to controls. VEGFA levels in glomeruli was significantly affected by the interaction of diabetes and mutation. VEGFA expression in diabetic *wt* was increased compared to *wt* control, but also compared to diabetic *Hif1 α ^{+/-}*. WT1 is required for a normal podocyte function. Due to the mutation was WT1 expression reduced in *wt* controls compare to *Hif1 α ^{+/-}* controls. Additionally, the level of WT1 was decreased by diabetic environment. Diabetes reduced expression of a negative regulator of apoptosis, *Ntn1*, in the kidney cortex, which can be associated with an increased number of apoptotic cells in the kidneys. Our results suggest that HIF1 α has a protective role in the development of early stage of DN and that impairment of HIF1 α pathways may play a functionally causative role in DN and more rapid disease progression.

Key words: Tgf β 1, Ctgf, Sox9, AngII, Vegfa, Wt1, Ntn1, Hif1 α ^{+/-} (in Czech)

Abstrakt

Diabetická nefropatie (DN) je jednou z nejčastějších příčin terminálního selhání ledvin, rozvíjí se u více než 10% diabetiků. Hyperglykemie v tkáních vede k aktivaci alternativních drah metabolismu glukosy (glykace, aktivace proteinkinasy C a polyolová dráha). Vlivem těchto biochemických odchylek dochází v tkáních k rozvoji hypoxie a ke zvyšování oxidačního stresu tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS). Odpověď buňky na hypoxii je řízena hypoxií-indukovaným faktorem 1 (HIF1), který se podílí na regulaci více než 800 genů. Cílové molekuly HIF1 dráhy se účastní celé řady fyziologických i patologických procesů, např. angiogeneze, energetického metabolismu, regulace pH, apoptózy, migrace a proliferace. Vznik DN je spojen s patologickou remodelací tkáně procesem epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) a rozvojem zánětu. Na regulaci klíčových molekul těchto patologických procesů se významně podílí také HIF1 transkripční faktor. V patologické remodelaci tkání reguluje expresi TGFβ1, CTGF, SOX9 a při rozvoji zánětu reguluje VEGFA a AngII. Přesto role HIF1 signalizace v rozvoji DN není dosud plně objasněna. Tato diplomová práce se zabývá hodnocením funkční role HIF1 signální dráhy při rozvoji DN s využitím heterozygotního mutantu s delecí *Hif1α*. Vlivem částečné delece *Hif1α* a působením diabetického prostředí došlo ke stimulaci profibrotických a zánětlivých procesů. Byla zjištěna změna exprese molekul, které jsou aktivátory EMT a vedou ke hromadění a zvýšené syntéze složek mezibuněčné hmoty. Exprese *Tgfβ1*, *Ctgf*, *Sox9* byla významně ovlivněna působením diabetického prostředí a mutace, přičemž *Hif1α*^{+/-} mutant vykazoval zhoršenou odpověď na diabetické prostředí. Částečná delece *Hif1α* způsobila vysokou variabilitu v expresi *Vegfa*, kdy někteří *Hif1α*^{+/-} mutanti měli až 10-ti násobně vyšší nebo nižší expresi v porovnání s kontrolami. Hladina VEGFA v glomerulech byla významně ovlivněna vzájemnou interakcí diabetu a mutace, u diabetických došlo k navýšení exprese VEGFA oproti kontrole wt, ale i oproti diabetickým *Hif1α*^{+/-}. WT1 je nezbytný pro funkci podocytů, nejdůležitějších ledvinných buněk. Vlivem mutace byla snížena exprese WT1 mezi wt kontrolami a *Hif1α*^{+/-} kontrolami. K dalšímu snížení hladiny WT1 došlo vlivem diabetického prostředí u diabetických *Hif1α*^{+/-} oproti diabetickým wt. Diabetes snížil expresi negativního regulátoru apoptózy, *Ntn1*, v ledvinné kůře, čemuž odpovídalo navýšení počtu apoptických buněk v ledvině. Naše výsledky naznačují, že HIF1α má protektivní funkci v rané fázi DN a že porušení HIF1α signalizace může mít za následek rychlejší progresy DN.

Klíčová slova: Tgfβ1, Ctgf, Sox9, AngII, Vegfa, Wt1, Ntn1, Hif1α^{+/-}

Seznam použitých zkratk

AGE pokročilé produkty glykace (z anglického „advanced glycation end-products“)

Agtr1a gen kódující podjednotku 1a receptoru pro Angiotensin II (z anglického „angiotensin II receptor, type 1a“)

AngII angiotenzin II

ANOVA statistická metoda analýza rozptylu

AT1, AT2 podjednotka 1/2 receptoru pro Angiotensin II (z anglického „angiotensin II receptor, type 1/2“)

bHLH strukturní motiv bazický-šroubovice-otáčka-šroubovice (z anglického „basic helix-loop-helix“)

BSA hovězí sérový albumin

CCN skupina proteinů (zkratka vytvořena z názvů proteinů CYR61 („cysteine-rich angiogenic protein 61“), CTGF („connective tissue growth factor“) a NOV („nephroblastoma overexpressed“)

CCN2 alternativní název pro CTGF

cDNA komplementární deoxyribonukleová kyselina

Cq kvantifikační cyklu (z anglického „quantification cycle“)

Ctgf gen kódující pojivový růstový faktor (z anglického „connective tissue growth factor“)

CTGF pojivový růstový faktor (z anglického „connective tissue growth factor“)

DM *diabetes mellitus*

DMSO dimethylsulfoxid

DN diabetická nefropatie

DNA deoxyribonukleová kyselina

DPX směs distyrenu, změkčovače (dibutylftalát) a xylenu (z anglického „distyrene, plasticizer, xylene“)

DTT dithiotreitol

ECM extracelulární matrix

EDTA ethylendiamintetraoctová kyselina

EM elektronová mikroskopie

EMT epiteliálně-mezenchymální tranzice

EndMT endoteliálně-mezenchymální tranzice

FSP1 specifický protein pro fibroblasty 1 (z anglického „fibroblast specific protein 1“)

FVB z anglického „friend leukemia virus B“

GDF růstový diferenciační faktor (z anglického „growth differentiation factor“),

GLUT1 glukosový transpórtér 1

GLUT2 glukosový transpórtér 2

HIF1, HIF2, HIF3 hypoxií indukovaný faktor 1,2,3 (z anglického „hypoxia-inducible factor 1, 2, 3“)

HIF1 α / HIF1 β hypoxií indukovaný faktor 1 α / hypoxií indukovaný faktor 1 α β

Hif1 α gen kódující hypoxií indukovaný faktor 1 α (z anglického „hypoxia-inducible factor 1 α “)

Hif1 α ^{+/-} heterozygotní mutant s delecí *Hif1 α* na jedné alele

HK2 buňky buněčné line proximálních tubulů (z anglického „human kidney“)

HMG (z anglického „high mobility group“)

Hprt1 gen kódující hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu 1 (z anglického „hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1“)

HRE (z anglického „hypoxia response elements“)

M mol/dm³

mRNA messenger RNA

N počet jednotek

NADH nikotinamidadenin dinukleotid

NADPH nikotinamidadenin dinukleotid fosfát

NF- κ B nukleární faktor κ B

Ntn1 gen kódující netrin-1

NTN1 netrin 1

Ntn1^{+/-} heterozygotní mutant s delecí netrin-1 na jedné alele

ODD doména závislá na koncentraci kyslíku (z anglického „oxygen-dependent degradation“)

ot otáčky

P pravděpodobnost při testování hypotézy

PAS proteinová doména (název složen složen z zkratk anglických názvů proteinů: PER („period clock protein“), ARNT („aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“), SIM („single-minded protein“))

PBS pufr (složení viz. kapitola 3.1.5 Složení použitých roztoků, str. 34)

PCR polymerasová řetězová reakce (z anglického „polymerase chain reaction“)

PFA paraformaldehyd

pH záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů

PHD1/2/3 prolylhydroxylasa izoformy 1/2/3

PKC proteinkinasa C

pVHL protein Von Hippel–Lindau tumor supresor

qPCR kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (z anglického „quantitative polymerase chain reaction“)

RAAS renin-angiotenzin-aldosteron systém

RAGE receptory pokročilých produktů glykace (z anglického „receptor for advanced glycation end-products“)

RNA ribonukleová kyselina

ROS reaktivní formy kyslíku (z anglického „reactive oxygen species“)

SDS dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE elektroforéza na akrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného

Ser aminokyselina Serin

Sox9 gen kódující SRY- („sex determining region Y“) box 9

SOX9 SRY- („sex determining region Y“) box 9

STZ streptozocin (N-(methylnitrosokarbamoyl)- α -D-glukosamin)

TAD transaktivační doména

TBE pufr (složení viz. kapitola 3.1. Složení použitých roztoků, str. 33)

TBST pufr (složení viz. kapitola 3.1. Složení použitých roztoků, str. 34)

TEMED tetramethylethylendiamin

TGF β transformující růstový faktor beta (z anglického „transforming growth factor beta“)

Tgfb1 gen kódující protein transformující růstový faktor beta 1
(z anglického „transforming growth factor beta 1“)

TGF β 1 transformující růstový faktor beta izoforma 1 (z anglického „transforming growth factor beta“)

Tgfb1^{-/-} homozygotní mutant s úplnou delecí *Tgfb1* na obou alelách

Thr aminokyselina Threonin

TNF faktor nádorové nekrózy (z anglického „tumor necrosis factor“)

Tris 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

TUNEL (z anglického „terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“)

T β RI/II receptor pro TGF β 1 typ I/II

Vegfa gen kódující vaskulární endoteliální růstový faktor A (z anglického „vascular endothelial growth factor A“)

VEGFA vaskulární endoteliální růstový faktor A (z anglického „vascular endothelial growth factor A“)

VEGFR1, VEGFR2 receptor 1, respektive 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor (z anglického „vascular endothelial growth factor receptor 1, 2“)

wt divoký typ (z anglického „wild type“)

Wt1 gen kódující protein Wilmsova tumoru 1

WT1 Wilmsova tumoru 1

α SMA alfa aktin hladké svaloviny (z anglického „ α -smooth muscle actin“)

Obsah

1. Teoretický úvod.....	14
1.1 Diabetes mellitus.....	14
1.2 Diabetická nefropatie (DN).....	14
Histologický obraz diabetické nefropatie	15
Mechanismy rozvoje diabetické nefropatie.....	18
1.3 Hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF1)	21
1.4 Cílové molekuly HIF1 signalizace při rozvoji diabetické nefropatie	25
2. Cíle práce.....	29
3. Materiál.....	30
3.1 Komerční soupravy	30
3.2 Primery.....	31
3.3 Chemikálie	32
3.4 Enzymy	33
3.5 Protilátky	33
Primární protilátky.....	33
Sekundární protilátky	33
3.6 Složení použitých roztoků.....	33
3.7 Polyakrylamidové gely.....	34
3.8 Laboratorní přístroje a zařízení	35
3.9 Ostatní materiál	36
4. Metody.....	37
4.1 Experimentální myši model	37
Charakteristika modelového organismu.....	37
Izolace DNA a určení genotypu	38
Indukce diabetes mellitus	40

Odběr ledvin	40
4.2 Izolace RNA.....	40
4.3 Reverzní transkripce.....	41
4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	42
Zpracování výsledků qPCR.....	43
4.5 Izolace proteinů.....	44
Izolace jaderné frakce.....	44
4.6 Přenos a imunochemická detekce proteinů	45
Elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	45
Přenos a imunochemická detekce HIF1 α („western blot“)	45
4.7 Histologická analýza	47
Příprava řezů.....	47
Histologické barvení.....	48
Imunohistochemické barvení.....	49
Detekce úrovně apoptózy metodou TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“).....	50
4.8 Statistické metody	51
5. Výsledky.....	52
5.1 Popis modelového organismu	52
5.1.1 Histologická analýza ledvin	53
5.2 Relativní exprese vybraných genů	55
5.3 Imunohistochemické stanovení exprese proteinů VEGFA a WT1	58
5.4 Analýza exprese HIF1 α v ledvinné kůře.....	59
6. Diskuze	61
7. Závěr	66

1. Teoretický úvod

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je chronické metabolické onemocnění vyznačující se poruchami homeostázy glukosy. Poruchy metabolismu glukosy vedoucí k hyperglykémii jsou způsobeny nedostatečnou tvorbou inzulínu nebo sníženou vnímavostí na inzulín. Počet diabetiků celosvětově neustále stoupá, v roce 2008 bylo diagnostikováno 347 miliónů diabetiků, což je více než dvojnásobný nárůst oproti roku 1980, kdy bylo diagnostikováno pouze 153 miliónů diabetiků (Danaei, Finucane et al. 2011). Tento trend je patrný i v České republice, kde byl v letech 2000 a 2010 zaznamenán téměř čtvrtinový nárůst diabetiků. V současné době se počty diabetiků v České republice odhadují na 800 tisíc nemocných (Diabetologická asociace ČR 2014)). Tento nárůst počtu diabetiků je dán především změnou životního stylu (sedavé zaměstnání, nadměrný příjem potravy), ale je také ovlivněn genetickou predispozicí. Podle etiologie lze rozlišit toto onemocnění na čtyři typy: *diabetes mellitus* 1. typu, 2. typu, gestační a ostatní specifické typy. Vedle *diabetes mellitus* existují i další poruchy homeostázy glukosy, kam řadíme hraniční glykémii nalačno a porušenou glukosovou toleranci. Tyto poruchy mohou následně vést k rozvoji *diabetes mellitus*. Hladina glukosy v krvi je hlavním parametrem při diagnostice. Pokud hladina glukosy přesáhne 7,0 mmol/l při testu nalačno, nebo při náhodném testu 11,1 mmol/l, je jedinci diagnostikován *diabetes mellitus* (Alberti a Zimmet 1998, Kuzuya, Nakagawa et al. 2002, Bartoš 2011).

Diabetes mellitus je spojen se závažnými chronickými komplikacemi, postihující především srdce (kardiomyopatie), oční sítnici (oftalmopatie), nervy (neuropatie) a ledviny (nefropatie) (Diabetologická asociace ČR 2014).

1.2 Diabetická nefropatie (DN)

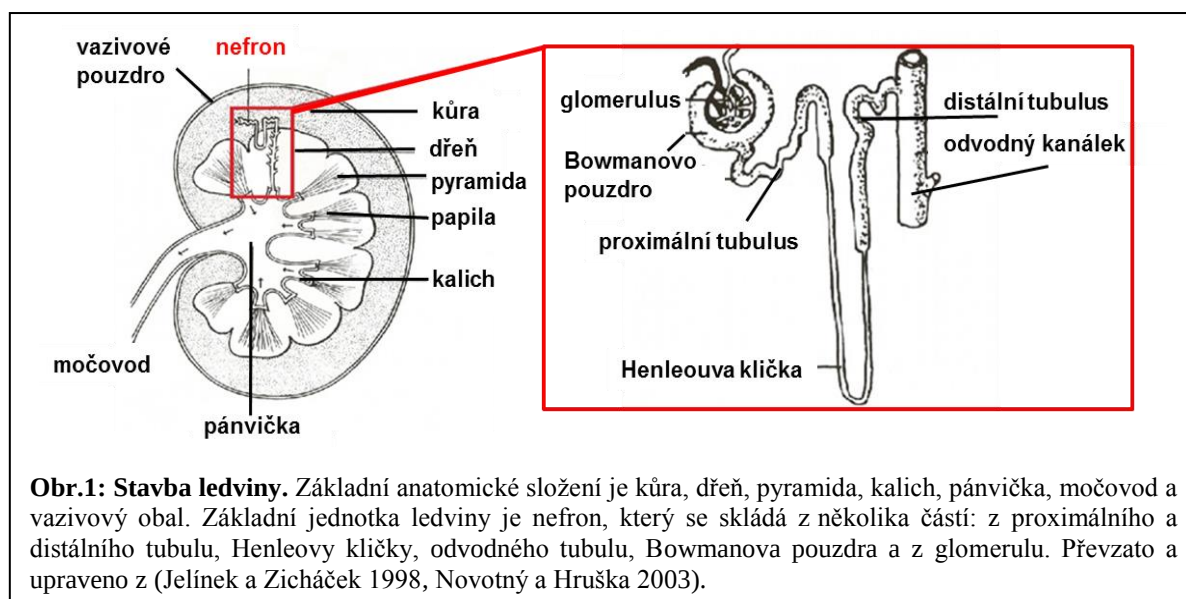
Diabetická nefropatie (DN) je jednou z nejčastějších příčin terminálního selhání ledvin. Rozvíjí se u více než 10% diabetiků jako chronická komplikace *diabetes mellitus* vlivem hyperglykémie a dalších rizikových faktorů (např. hypertenze, kouření, dyslipidemie (Dronavalli, Duka et al. 2008, ČR 2014)). Působením těchto faktorů dochází k poškození ledvin. Postupně se snižuje jejich filtrační schopnost, neboť dochází k poškození filtračních bariér, které se rozpadají nebo jsou nahrazeny nefunkční fibrotickou tkání, a nejsou dále

schopny zadržovat velké molekuly, např. proteiny, které přechází do moče. Detekce proteinů v moči je primárním klinickým projevem diabetické nefropatie. Nejprve je detekován albumin, kdy mluvíme o tzv. albuminurii (300 mg/24 h) a pokud nepřichází včasná léčba, v moči se objevují i další proteiny, mluvíme pak o proteinurii. Rozvoj proteinurie vede ke zhoršení kvality života nemocného a zvyšuje riziko rozvoje dalších komplikací, zejména kardiomyopatie (Lindner, Monks et al. 2003, Dronavalli, Duka et. al. 2008).

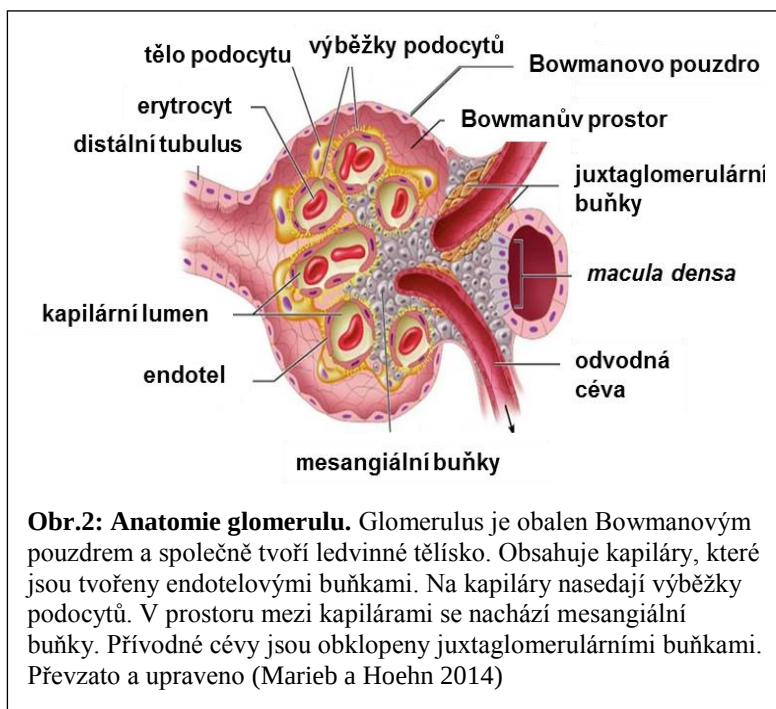
Histologický obraz diabetické nefropatie

Morfologie ledviny

Ledvina je párový orgán nacházející se v dutině břišní. Je obalena pevným vazivovým obalem (*capsula fibrosa*), a dělena na dva základní anatomické celky: **kůru** (*cortex renalis*) a **dřeň** (*medulla renalis*) (obr.1). Dřeň je uspořádána do pyramid (*pyramides renalis*), jejichž papily (*papilla renalis*) se upínají na ledvinné kalichy (*calix renalis minor et major*), které přecházejí do ledvinné pánvičky (*pelvis renalis*), ze které vystupuje močovod (*ureter*). Dřeň je tvořena převážně vazivem, není hojně zásobena krví, proto je možné ji makroskopicky odlišit od kůry, oproti které má výrazně světlejší barvu. V kůře se pak nachází převážná část nefronu, který je základní funkční jednotkou ledviny. Nefron se skládá z několika částí: z proximálního tubulu (*tubulus proximalis*) a distálního tubulu (*tubulus distalis*), Henleovy kličky (*ansa nephroni*), odvodného kanálku. Odvodný kanálek je tvořen *tubulus colligens*, *ductus colligens* a *ductus papillaris*, Bowmanova pouzdra (*capsula glomeruli*) a z glomerulu.



V ledvině se nalézá 1-4 milióny nefronů. Nefron je v ledvině orientován tak, že glomerulus, Bowmanovo pouzdro, proximální tubulus a distální tubulus se nalézají v kůře. Henleova klička a odvodný kanálek se nacházejí ve dřeni (Čihák, Grim et al. 2002). Glomerulus je obalen Bowmanovým pouzdem a společně tvoří ledvinné tělísko (*corpusculum renis*) (obr.2). Glomerulus je tvořen sítí kapilár. Stěna glomerulárních

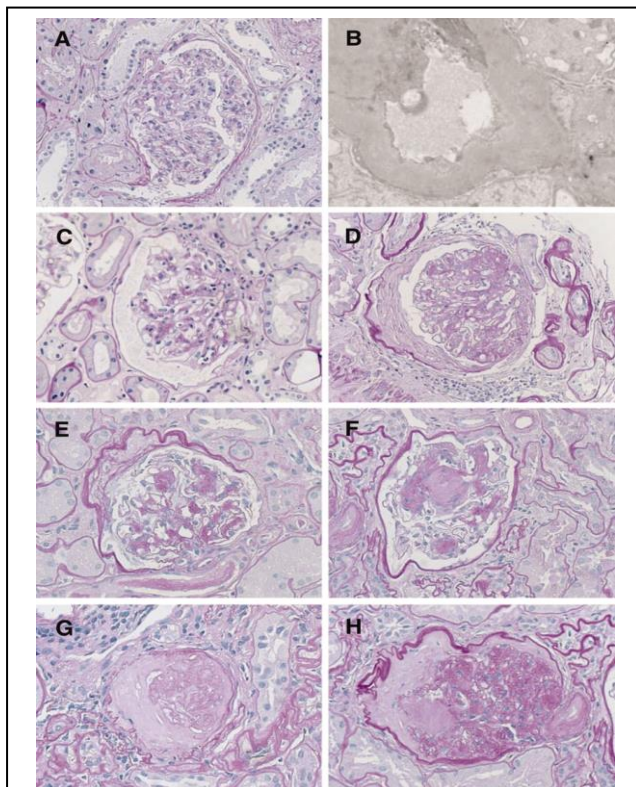


kapilár je tvořena endotelovými buňkami. Tyto buňky obsahují póry o průměru 70-90 nm. Na povrch endotelových buněk přiléhají výběžky podocytů. Podocyty jsou modifikovaný plochý epitel hvězdicového tvaru s velkým počtem výběžků. Výběžky nasedají na bazální laminu endotelových buněk tak, že mezi nimi vznikají filtrační štěrby. Těla

podocytů jsou od stěn kapilár vzdálena a vzniká kolem nich filtrační prostor. Bazální lamina podocytů splývá s bazální laminou kapilár a společně formují vícevrstevnou membránu. Tato membrána je významnou složkou filtrační membrány. Mezi kapilárami se nalézají tzv. mesangiální buňky, které se podílí na filtraci a mají řadu unikátních vlastností. Jsou schopny fagocytózy, kontrakce a proliferace. Díky těmto schopnostem se podílejí na filtraci, kontrolují složení bazální membrány, slouží jako mechanická opora pro kapiláry a díky kontraktilitě jsou schopny regulovat průtok krve kapilárami v glomerulu. U přírodních cév se nacházejí buňky, které ve své cytoplazmě mají osmiofilní granula tzv. juxtaglomerulární buňky. V tomto místě má stěna přírodní cévy pozměněnou morfologii. Póry endotelu nejsou překryty diafragmou a nacházejí se zde *macula densa* distálního tubulu, která ve své cytoplazmě obsahuje sekreční granula. Mesangiální buňky, juxtaglomerulární buňky a *macula densa* tvoří tzv. juxtaglomerulární aparát, který má endokrinní funkci, syntetizuje hormony renin, angiotenzinogen a erythropoetin (Čihák, Grim et al. 2002).

Histopatologický obraz – patologické hodnocení

Morfologické hodnocení diabetické nefropatie je založeno na hodnocení glomerulárních, tubulointersticiálních a vaskulárních změn. Základními sledovanými parametry jsou velikost mesangiální expanze v glomerulu, tloušťka glomerulární bazální membrány a dále se hodnotí postup fibrózy intersticia a tubulů. Podle histologického obrazu, byla vytvořena klasifikace DN na čtyři třídy poškození podle progresu onemocnění (obr.3) (Pfaffl 2001, Drummond a Mauer 2002, Fioretto a Mauer 2007). *První třída* poškození zahrnuje mírné



Obr.3: Klasifikace DN. Reprezentativní příklady morfologických změn při DN. *První třída (A)* glomerulus s mírnou změnou v mesangiu a Bowmanovu pouzdro (*B*) ztlustění glomerulární bazální membrány (EM). *Druhá třída (C, D)* rozšíření mesangia. *Třetí třída (E, F)* nodulární skleróza, glomerulus (*F*) obsahuje Kimmelstiel-Wilsonovy léze. *Čtvrtá třída (G, H)* pokročilá DN. DN – diabetická nefropatie, EM – elektronová mikroskopie (Tervaert, Mooyaart et al. 2010)

či nespecifické změny v histologickém obrazu. Glomeruly hodnocené světelnou mikroskopií jsou klasifikovány jako „normální“ případně „téměř normální“ (obr.3A). Nejvýznamnějším parametrem je tloušťka glomerulární bazální membrány. Vlivem diabetického prostředí dochází ke ztlustění glomerulární bazální membrány v důsledku hromadění mezibuněčné hmoty a jejích základních složek, zejména kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu. K hromadění může docházet vlivem zvýšené produkce těchto proteinů, sníženou proteinovou degradací nebo kombinací obou vlivů. Ke ztlustění glomerulární bazální membrány dochází před vznikem albuminurie, tedy před prvním klinickým projevem DN. Tato změna

je sledovatelná pouze elektronovou mikroskopií (obr.3B). *Druhá třída* poškození je sledovatelná už světelnou mikroskopií. Zahrnuje změny v mesangiálním prostoru, kde dochází k hromadění mezibuněčné hmoty, díky které se mesangium zvětšuje (obr.3C, D).

O zvětšení mesangia mluvíme, pokud je množství mezibuněčné hmoty větší než vzdálenost mezi jádry dvou mesangiálních buněk. Tato třída zahrnuje dvě podkategorie: *mírnou* a *závažnou expanzi mesangia*. Závažnost expanze je posuzována vzhledem k ploše lumenu kapilár. Pokud je plocha menší, resp. větší, než průměrná plocha lumenu kapiláry, jedná se o mírnou, resp. závažnou expanzi. *Třetí třída* poškození je definována jako nodulární skleróza s postižením méně než poloviny glomerulů (obr.3E, str. 15). Tvoří se tzv. Kimmelstiel-Wilsonovy léze, které poškozují kapilární systém (obr.3G, str. 15). Tyto léze jsou sférické, eozinofilní, s centrální acelulární oblastí a mohou být obklopeny prstencem buněk. *Čtvrtá třída* poškození odpovídá pokročilé DN. Více než polovina glomerulů vykazuje významné histologické změny, jako jsou léze a zvýšené množství proteinu mezibuněčné hmoty (obr.3G, H, str. 15) (Tervaert, Mooyaart et al. 2010).

Mechanismy rozvoje diabetické nefropatie

Diabetická nefropatie je komplexním onemocněním, na jejímž vzniku a rozvoji se podílí celá řada faktorů. Základním rizikovým faktorem je zvýšená koncentrace glukosy (hyperglykemie) (Dronavalli, Duka et al. 2008, Arora a Singh 2013). Při hyperglykémii v tkáních dochází k ovlivnění biochemických drah, kterých se glukosa účastní (Alberti a Zimmet 1998, Škrha 2009). Vždy ovšem záleží na kapacitě jednotlivých drah. Pokud koncentrace glukosy přesáhne kapacitu těchto drah, aktivují se dráhy alternativní. Např. aktivuje se polyolová dráha, dráha proteinkinasy C a dochází k modifikaci proteinů glykací v důsledku hyperglykemie (Dronavalli, Duka et al. 2008, Gnudi 2012, Sun, Su et al. 2013). Vlivem biochemických odchylek dochází ke komplexnímu poškození tkáně na buněčné úrovni. Jsou aktivovány signalizační kaskády, které mění vlastnosti i funkci ledvinných buněk v procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice a endoteliálně-mezenchymální tranzice nebo aktivují proces programované buněčné smrti (apoptóza) (Ortiz, Ziyadeh et al. 1997, Kumar, Robertson et al. 2004, Liu 2004, Susztak, Raff et al. 2006, Menini, Iacobini et al. 2007).

Alternativní biochemické dráhy aktivované hyperglykemií

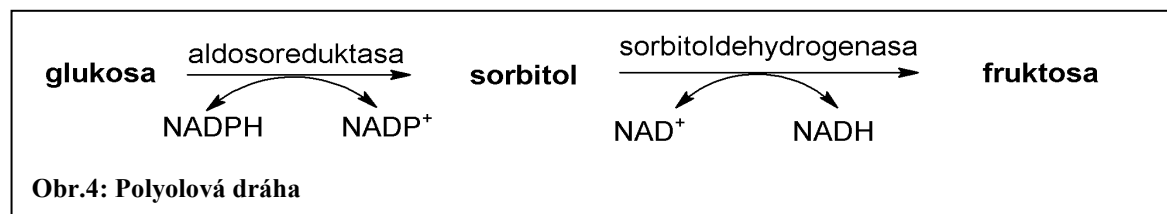
Modifikace proteinů glykací

Při hyperglykemii dochází ke zvýšené vazbě glukosy na volné aminoskupiny (převážně ϵ -aminoskupinu lysinu). Tento proces se nazývá glykace. Jako produkt vzniká při glykaci ketoamin. Z těchto ketoaminů se dále tvoří pokročilé produkty glykace (AGE z anglického „advanced glycation end-product“).

AGE se pak kovalentně váží k proteinům a tím mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (Peyroux and Sternberg 2006, Nelson, L. et al. 2008). Takto modifikované proteiny mají zcela odlišné biologické vlastnosti (poločas života, aktivita enzymů) oproti nemodifikovaným proteinům. Díky těmto odchylkám dochází ke změnám vlastností tkání, které přestávají plnit svou původní funkci (Škrha 2009). Na povrchu řady buněk, jako jsou endoteliální buňky a makrofágy, jsou lokalizovány specifické receptory pro AGE (tzv. RAGE). Vazba AGE na jejich receptor aktivuje uvolnění řady cytokinů, které pak spouští buněčnou odpověď na patologické prostředí (Peyroux a Sternberg 2006, Gnudi 2012).

Polyolová dráha

Polyolová dráha je alternativní dráha pro metabolismus glukosy. Tato dráha se aktivuje nadbytkem glukosy (Brownlee 2005). Glukosa je přeměněna pomocí aldosoreduktasy na sorbitol (obr.4). Při této přeměně je spotřebován NADPH, který je využíván antioxidačním aparátem k redukci glutahionu. Nedostatek NADPH v buňce, způsobuje oxidační stres. Přeměna sorbitolu na fruktosu je katalyzována sorbitoldehydrogenasou, při této reakci vzniká NADH. V buňce se posouvá poměr NAD^+/NADH ve prospěch NADH. Takto v buňce vzniká hyperglykemická pseudohypoxie (Chung, Ho et al. 2003, Brownlee 2005).



Abnormální aktivace proteinkinasy C

Proteinkinasa C (PKC) je označení pro skupinu Ser/Thr kinas, které se vyskytují v 15 izoformách. Nejčastější izoformy, které jsou aktivovány v cévním řečišti diabetických zvířecích modelů, jsou beta- a delta-. V případě DN a retinopatie dochází k aktivaci i jiných izoform (Koya a King 1998). Úloha této skupiny kinas při rozvoji DN je intenzivně studována. U diabetických *Pkcα*^{-/-} se nerozvíjí albuminurie díky úplné delecii alfa izoformy, inhibice beta izoformy zajišťuje ochranu před rozvojem DN (Geraldes a King 2010). Zvýšená aktivita PKC vede ke tvorbě cytokinů a mezibuněčné hmoty (hlavně kolagenu IV), dochází k rozvoji patologických změn cévních stěn a zvyšuje se oxidační stres (Škrha 2009, Arora a Singh 2013).

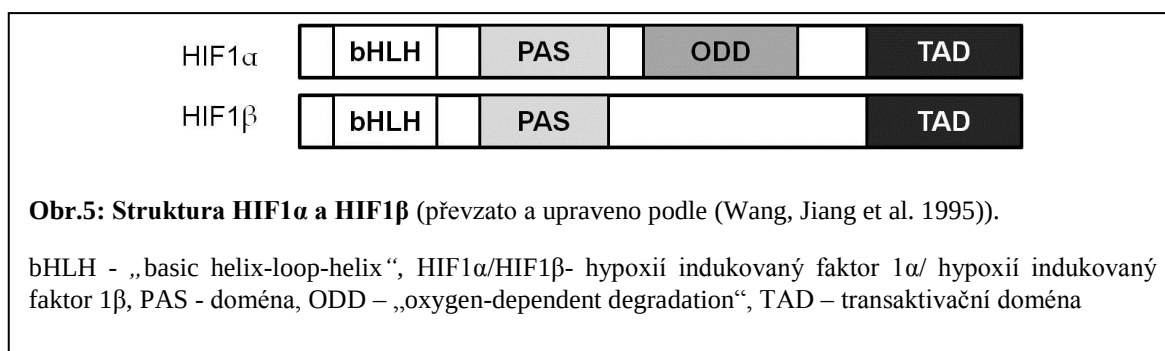
Molekulární procesy rozvoje diabetické nefropatie

Hypoxie

Hypoxie je stav, kdy jsou tkáně nedostatečně zásobeny kyslíkem. Tento stav nastává při poškození cév v ledvině. Podle velikosti cév rozlišujeme dva druhy angiopatie. Pokud jsou poškozeny malé cévy, jedná se o mikroangiopatii, pokud jsou však poškozeny velké cévy, jedná se o makroangiopatii. K poškození cévních endotelových buněk dochází vlivem zvýšené stimulace alternativních drah, jako je tvorba AGE a aktivace PKC (Kelly, Burford et al. 2009). Vedle hypoxie může v buňce nastat i pseudohypoxie a to v případě, že došlo ke změně poměru NAD^+/NADH . K největším změnám v tomto poměru dochází vlivem polyolové dráhy (Chung, Ho et al. 2003, Brownlee 2005). Hypoxie a pseudohypoxie vede ke zvyšování oxidačního stresu uvnitř tkání, který vzniká při nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS z anglického „reactive oxygen species“), které se tvoří v mitochondriích (Clanton 2007, Habib 2013, Heilig, Deb et al. 2013). Jedním z hlavních regulátorů odpovědi buňky na hypoxické prostředí je transkripční faktor – hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF1) (Wang, Jiang et al. 1995, Dehne a Brune 2009).

1.3 Hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF1)

Hypoxií indukovaný faktor 1 je protein z rodiny bHLH (z anglického „basic helix-loop-helix“) transkripčních faktorů. Je exprimován ve všech typech tkání. (Wang, Jiang et al. 1995, Semenza 2000). Jedná se o heterodimer složený z podjednotky HIF1 α a podjednotky HIF1 β (obr.5). HIF1 α podjednotka obsahuje bHLH doménu, PAS doménu (tato doména byla pojmenována podle proteinů, ve kterých byla poprvé identifikována - „period clock protein“ (PER), „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT), „single-minded protein“ (SIM) (Taylor a Zhulin 1999)), ODD doménu (z anglického „oxygen dependent degradation“) a dvě transaktivační domény (TAD). PAS a bHLH domény jsou nezbytné pro dimerizaci a bazická doména slouží k vazbě na DNA. Podjednotka HIF1 β obsahuje také bHLH, PAS a TAD domény, avšak neobsahuje ODD doménu (Wang, Jiang et al. 1995). Podjednotka HIF1 β je konstitutivně exprimována.



Na regulaci transkripční aktivity a exprese podjednotky HIF1 α závisí biologická aktivita celého dimeru a zahrnuje regulaci transkripce, translace a potranslační modifikace HIF1 α podjednotky. Hlavním regulačním mechanismem je hydroxylace HIF1 α podjednotky, která je závislá na koncentraci kyslíku. Při normoxii dochází k hydroxylaci prolylových reziduí ODD domény prolylhydroxylasami (PHD1, PHD2, PHD3). Hydroxylované proliny umožňují specifické rozpoznání von Hippel-Lindau proteinem (pVHL). Tento protein společně s komplexem elonginu B a elonginu C pracuje jako E3 ubikvitinligasa pro HIF1 α . Po rozpoznání hydroxylované HIF1 α podjednotky E3 komplexem následuje E2/E1 ubikvitinilace s následnou degradací v 26S proteosomu (Kaluz, Kaluzova et al. 2008). Při hypoxii dochází k inhibici hydroxylace HIF1 α podjednotky. Ta vede k akumulaci proteinu a k dimerizaci s HIF1 β podjednotkou (Semenza 2001, Catrina, Okamoto et al. 2004, Tan, Gu et al. 2008).

Transkripční aktivita HIF1 α je závislá na dvou transkripčních koaktivátorech CBP/p300, které se váží na TAD doménu na C-konci HIF1 α podjednotky. Po dimerizaci a transaktivaci je HIF1 plně funkční a řídí transkripci genů vazbou na jejich promotorové sekvence obsahující tzv. „hypoxia response elements“ (HRE). HRE obsahují sekvenci 5'-CGTG-3', na kterou se váže HIF1 (Semenza 2000, Hagg and Wennstrom 2005).

Apoptóza

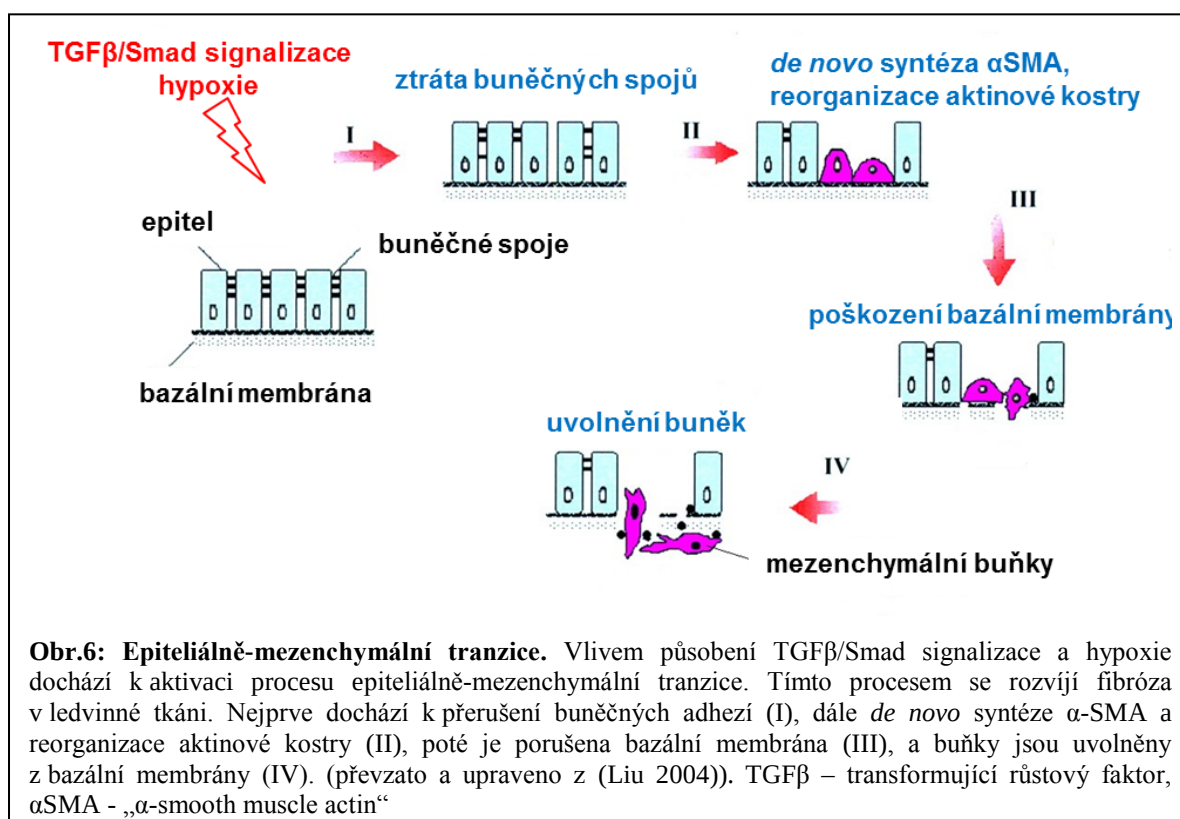
Apoptóza je proces programované buněčné smrti. Apoptóza je velmi podstatný proces v rozvoji diabetické nefropatie, kterým zanikají epitelální buňky tvořící tubulární struktury. Vysoká koncentrace glukosy (30mM) zvyšuje apoptické změny u HK2 buněk (Verzola, Bertolotto et al. 2004). Mechanismus, kterým hyperglykemie aktivuje apoptózu, není stále plně objasněn. Mezi aktivátory apoptózy patří cytokiny (faktor nádorové nekrózy (TNF)), hormony (angiotenzin II), ale také přímé produkty biochemických odchylek jako jsou ROS a AGE (Velagapudi, Bhandari et al. 2011, Habib 2013). Existují dvě základní signální dráhy regulující apoptózu, a to *exogenní dráha* (tzv. „death-receptor“ dráha) a *endogenní dráha* (tzv. mitochondriální dráha), které mezi sebou komunikují a navzájem se ovlivňují svými signálními molekulami. Apoptické buňky vykazují celou řadu molekulárních změn – štěpení proteinů, síťování proteinů (tzv. „cross-linking“ proteinů) a fragmentaci DNA. Proteiny jsou štěpeny kaspasami, které specificky štěpí protein za kyselinou asparagovou. Kaspasy se nalézají ve své neaktivní formě proenzymu prakticky ve všech buňkách. Aktivaci prokaspas dochází ke stimulaci proteolytické kaskády. Síťování proteinů je zajišťováno enzymem transglutaminasa, který katalyzuje vznik isopeptidové vazby mezi karboxylovou skupinou glutamové kyseliny jednoho peptidu s aminoskupinou lysinu druhého peptidu. Dalším typickým znakem apoptózy je fragmentace DNA na úseky velké přibližně 180-200 párů bazí. Fragmentace DNA je závislá na koncentraci vápenatých a hořečnatých iontů. Koncentrace těchto iontů ovlivňuje aktivitu endonukleas, tedy enzymů schopných štěpit DNA (Susztak, Raff et al. 2006, Elmore 2007). *Exogenní dráha* je vedena přes exogenní podnět pomocí specifických transmembránových receptorů, označovaných jako „death-receptors“. Tyto receptory patří do skupiny receptorů TNF, které ve své struktuře obsahují motiv 80 aminokyselin nazývaný „death domain“. Vazbou specifického ligandu na receptor (např. FasL/FasR, TNF α /TNFR1) se přenáší signál do cytoplazmy, kde dojde k aktivaci prokaspasy 8.

Endogenní dráha není vedena pomocí transmembránového recetoru, ale je řízena aktivátorem vyskytujícím se v cytoplazmě. Aktivační signál může být pozitivní nebo negativní povahy. Negativní signál je nedostatek nějakého hormonu, růstového faktoru, případně cytokinu, který aktivuje apoptózu. Jedním z pozitivních faktorů je např. hypoxie. Všechny tyto faktory vedou k poškození vnitřní mitochondriální membrány, ve které dochází ke změně velikosti pórů, membránového potenciálu a uvolnění proapoptických proteinů z mitochondriální membrány do cytoplazmy, např. cytochrom c. Jedním z možných mechanismů je aktivace prokaspasy 8. Obě dráhy přechází v tzv. *exekuční fázi*, ve které dochází k dokončení buněčné smrti. Jsou aktivovány exekuční kaspasy, které aktivují endonukleasy, ty pak štěpí DNA, a další kaspasy, které degradují jaderné a cytoskeletární proteiny. Kaspasa 3 je považována za nejdůležitější exekuční kaspasu, která může být aktivována ostatními kaspasami (Elmore 2007).

HIF1 transkripční faktor zastává významnou funkční roli při regulaci této závěrečné fáze apoptózy. HIF1 reguluje expresi kaspasy 3 (Van Hoecke, Prigent-Tessier et al. 2007) a podílí se na regulaci síťování proteinů, přes regulaci exprese enzymu transglutaminasy (Jang, Jeon et al. 2010). Jedním z proteinů s antiapoptickým účinkem je netrin-1, který také podléhá regulaci HIF1 (Wang, Reeves et al. 2009). HIF1 je také jedním z pravděpodobných regulátorů apoptózy při rozvoji diabetické nefropatie (Kumar, Robertson et al. 2004).

Epiteliálně-mezenchymální tranzice

Transdiferenciace epiteliálních buněk v buňky mezenchymové je proces, označovaný jako epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). EMT je klasifikováno podle funkce, kterou plní do třech tříd **1) EMT při embryogenezi a vývoji orgánů**, **2) EMT při regeneraci tkáně a rozvoji orgánové fibrózy**, **3) EMT při rozvoji rakovinného bujení a vzniku metastáz**. V ledvinné tkáni vlivem EMT dochází k rozvoji fibrózy. K aktivaci tohoto procesu dochází díky zánětlivým buňkám a fibroblastům, které uvolňují do okolí transformující růstový faktor β 1 (TGF β 1) (Kalluri a Weinberg 2009). Při tomto procesu epiteliální buňky, ztrácí své původní vlastnosti a získávají mezenchymální fenotyp (Liu 2010, Han, Zhu et al. 2013). Buňka podléhající tranzici ztrácí epiteliální znaky (E-kadherin) a naopak exprimuje mezenchymální proteiny, α SMA (z anglického „ α smooth muscle actin“), a kolagen (Arora a Singh 2013, Han, Zhu et al. 2013). V EMT nejprve dochází k přerušení buněčných adhezí, dále k *de novo* syntéze α SMA a k reorganizaci aktinové kostry, poté je porušena bazální membrána a buňky se uvolňují, zvyšuje se jejich hybnost a invazivnost (obr.6) (Liu 2004). Může dojít pouze k částečné změně fenotypu, kdy si buňky ponechávají některé ze svých epiteliálních vlastností, zároveň však získají vlastnosti mezenchymálních buněk.



Tyto buňky opouštějí epitelální vrstvu a akumulují se v intersticiu, kde ztrácí poslední epitelální vlastnosti. Je celá řada iniciátorů, které aktivují tento proces. Hlavním aktivátorem je TGFβ/Smad signalizace a hypoxie. Dále se na tranzici podílí „fibroblast specific protein 1“ (FSP1), jehož exprese v tubulech, indikuje výskyt fibroblastů, které se při normálních podmínkách téměř nevyskytují (Kalluri a Neilson 2003). Vlivem diabetického prostředí nedochází k tranzici pouze epitelálních buněk tubulů, ale také k tranzici endotelových buněk kapilár. Tento proces se nazývá endoteliálně-mezenchymální tranzice (EndMT). Průběh je podobný jako je tomu u EMT. Po uvolnění profibrotických faktorů TGFβ1, CTGF a AngII, dochází ke zvýšené sekreci a snížené degradaci mezibuněčné hmoty. Tímto procesem dochází ke ztrátě glomerulárních a peritubulárních kapilár, ke zvýšení počtu myofibroblastů a tím k rozvoji fibrózy (Loeffler a Wolf 2014).

1.4 Cílové molekuly HIF1 signalizace při rozvoji diabetické nefropatie

Cílové molekuly HIF1 dráhy se účastní celé řady fyziologických i patologických procesů, např. angiogeneze, energetického metabolismu, pH regulace, apoptózy, migrace a proliferace (Semenza 2004, Semenza 2007, Yee Koh, Spivak-Kroizman et al. 2008, Heilig, Deb et al. 2013). Vznik DN je spojen s patologickou remodelací tkáně a rozvojem zánětu. Na regulaci klíčových molekul těchto patologických procesů se významně podílí HIF1 transkripční faktor. V patologické remodelaci tkání reguluje expresi TGFβ1, CTGF, SOX9 a při rozvoji zánětu reguluje VEGFA a AngII (Kelly, Burford et al. 2009, Zhang, Yang et al. 2011). Přesto role HIF1 signalizace v rozvoji DN není dosud plně objasněna.

Transformující růstový faktor β 1(TGFβ1)

Transformující růstové faktory beta (TGFβ) jsou cytokiny, které se uplatňují při celé řadě dějů. Např. při regulaci buněčného růstu, diferenciaci, proliferaci, migraci a syntéze mezibuněčné hmoty. Většina typů buněk buď TGFβ vytváří, nebo je citlivá na účinek těchto cytokinů. Tato skupina cytokinů je charakterizována šesti konzervovanými cysteinovými rezidui a u savců včetně člověka zahrnuje více než 30 členů (TGFβ, BMP („bone morphogenetic protein“), GDF („growth differentiation factor“), aktiviny a inhibiny). TGFβ1 je hlavní izoforma, která má *in vivo* profibrotický účinek (Hill, Flyvbjerg et al. 2000). TGFβ1 je sekretován ve formě latentního komplexu, který je ukládán v mezibuněčné hmotě (Taipale, Miyazono et al. 1994).

Tento latentní komplex je aktivován pomocí AngII, ROS a AGE (Munger, Harpel et al. 1997). Biologicky aktivní TGFβ1 je ve formě homodimeru, který je stabilizován disulfidickými můstky. Na povrchu buněk se vyskytují dva typy receptorů TGFβ1 – typ jedna (TβRI) a typ dva (TβRII). Oba receptory jsou transmembránové Ser/Thr kinasové komplexy, které fosforylují signální molekuly Smad. Profibrotický účinek TGFβ1 je charakterizován akumulací mezibuněčné hmoty a aktivací epiteliálně-mezenchymální tranzice. Tento cytokin má i pozitivní vliv pro jeho výrazné protizánětlivé účinky, které byly potvrzeny na *Tgfb1*^{-/-} mutantovi. Úplná delece tohoto genu vede k rozvoji zánětu většiny orgánů, včetně ledvin (Kitamura a Suto 1997), ale i zvýšená exprese TGFβ1 v ledvině je spojována s rozvojem řady onemocnění ledvin (Lee 2013, Mariappan, DSilva et al. 2013, Loeffler a Wolf 2014). Funkční studie ukázaly, že částečná inhibice TGFβ1 exprese vedla ke snížení patologických změn ledvinové tkáně u DN a glomerulosklerózy (Ziyadeh 2004). Předpokládá se, že HIF1 signalizace a TGFβ/Smad3 signalizace jsou propojeny a mají navzájem synergní účinek při regulaci VEGF během normoxie, ale i hypoxie (Lee 2013).

Růstový faktor pojivové tkáně (CTGF)

Růstový faktor pojivové tkáně CTGF (z anglického „connective tissue growth factor“) neboli CCN2, je protein, který patří do skupiny CCN proteinů (extracelulární matrix-spojených heparin-vázajících proteinů), je sekretován do mezibuněčné hmoty. Tento růstový faktor se podílí na regulaci mnoha biologických procesů, jako je proliferace, migrace a angiogeneze (Qi, Chen et al. 2008, Nishida, Kondo et al. 2009). V nervové tkáni bylo prokázáno, že CTGF reguluje HIF1α expresi a transaktivaci HIF1α. Doposud není znám přesný mechanismus regulace, bylo však odhaleno regulační vazebné místo v promotoru *Hif1α* (Tran, Fujita et al. 2013). Exprese CTGF je pozitivně ovlivněna AGE, které se akumulují v mezibuněčné hmotě. Tento růstový faktor se uplatňuje při rozvoji glomerulosklerózy, jeho vlivem dochází k akumulaci mezibuněčné hmoty v glomerulu a k rozvoji fibrózy. Diabetické prostředí stimuluje expresi CTGF, což bylo potvrzeno pomocí experimentálních modelů (Riser, Denichilo et al. 2000, Murphy, Crean et al. 2008).

SRY- Box 9 (SOX9)

SRY- Box 9 (SOX9) je transkripční faktor, ze skupiny HMG DNA vazebných proteinů. Tento transkripční faktor hraje důležitou roli během embryonálního vývoje, kdy společně s dalšími proteiny reguluje vznik chrupavek a vývoj reprodukčního systému (Koopman 1999). Poprvé byl objeven při diferenciaci chondrocytů, kde reguluje expresi proteinů chondrocytů a hlavně pak kolagenu IV, který je hlavní složkou mezibuněčné hmoty mesangia (Ikeda, Kawaguchi et al. 2005). Po narození dochází k výraznému snížení exprese tohoto proteinu. Zvýšená exprese SOX9 byla popsána u celé řady vaskulárních a fibrotických onemocnění a dále také u rakoviny prostaty (Kishi, Abe et al. 2011). Při rozvoji DN se nejvíce projevuje jeho vliv na buňky mesangia, kdy dochází k ektopické produkci proteinů chondrocytů. Mezenchymální buňky tak mění svůj fenotyp, podléhají transdiferenciaci a vznikají buňky, které jsou svým fenotypem podobné chondrocytům. Díky těmto změnám v mesangiu dochází ke vzniku lézí a nevratných strukturálních změn ve struktuře ledviny (Kishi, Abe et al. 2011, Kolset, Reinholt et al. 2012, Brosius a Alpers 2013). Koimunoprecipitační testy potvrdily přímou vazbu HIF1 α v promotoru genu kódující Sox9, HIF1 α je jeho pozitivní regulátor (Zhang, Yang et al. 2011).

Vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGFA)

Vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGFA) je velmi důležitý hlavně pro endotelové buňky, mění permeabilitu stěn kapilár, dále ovlivňuje angiogenezi, migraci a buněčný růst, je i inhibitorem apoptózy (O'Hern a Fishbein 1968). Nejčastěji se vyskytuje ve formě homodimeru, který je spojen disulfidickými vazbami. V ledvině je velmi důležitý pro normální funkci glomerulárních buněk, protože stimuluje proliferaci a diferenciaci endoteliálních buněk, zvyšuje permeabilitu vlásečnic, uplatňuje se i v remodelaci tkáně (Schrijvers, Flyvbjerg et al. 2004). V ledvinách je konstitutivně exprimován v podocytech. Nejvíce exprimovanou izoformou je VEGFA 164 (Veron, Bertuccio et al. 2011). VEGFA se váže na specifické receptory (VEGFR1, VEGFR2). Tyto receptory se nachází na povrchu endotelových buněk, mesangiálních buněk a na povrchu podocytů. Vlivem *diabetes mellitus* dochází ke zvýšení exprese VEGFA a jeho receptorů (Veron, Bertuccio et al. 2011). Tato expresní změna je nejpatrnější v podocytech. V modelu rané DN bylo prokázáno, že se exprese VEGFA zvyšuje, oproti pozdním stádiím DN, kde se naopak snižuje. VEGFA má zásadní roli při rozvoji DN.

VEGFA má protektivní charakter, chrání endoteliální buňky glomerulů, a tím snižuje negativní efekt dlouhodobé hyperglykémie (de Vriese, Tilton et al. 2001, Petermann, Pippin et al. 2004, Schrijvers, Flyvbjerg et al. 2004, Hohenstein, Hausknecht et al. 2006, Gnudi 2012, Sivaskandarajah, Jeansson et al. 2012, Nakagawa, Sato et al. 2013).

Angiotenzin II (AngII)

Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS) hraje zásadní roli při kontrole krevního tlaku. Dále se podílí na regulaci zánětlivých procesů v tkáních. Pro rozvoj DN má významný vliv angiotenzin II (AngII) (Ruiz-Ortega, Ruperez et al. 2006). AngII způsobuje migraci zánětlivých buněk do ledvin, která je provázená zvýšenou produkcí zánětlivých cytokinů a chemokinů. Zásadním faktorem při rozvoji zánětu je nukleární faktor κB (NF- κB) (Ruiz-Ortega, Ruperez et al. 2006, Nangaku a Fujita 2008). Tento transkripční faktor se uplatňuje i při odpovědi na oxidační stres a reguluje HIF1 dráhu (Gorlach and Bonello 2008). AngII dále reguluje akumulaci mezibuněčné hmoty tím, že stimuluje endogenní produkci profibrotických růstových faktorů zejména TGF β 1 a CTGF. AngII je produkován převážně tubulárními buňkami a váže se na dva specifické receptory pro AngII, AT1 („angiotensin II receptor type 1“) a AT2 („angiotensin II receptor type 2“) (Riser, Denichilo et al. 2000, Ruiz-Ortega, Ruperez et al. 2006, Heilig, Deb et al. 2013). Pomocí zvířecích modelů bylo ukázáno, že blokace receptorů zpomaluje progresi DN (Imanishi, Yoshioka et al. 1997, Wolf a Ritz 2005).

Netrin-1 (Ntn-1)

Netrin-1 (Ntn-1) patří do skupiny netrinů. Tyto proteiny byly poprvé objeveny a studovány v souvislosti s vývojem nervové soustavy. Netrin-1 má hlavní úlohu při morfogenezi a migraci neuronů. Bylo prokázáno, že hraje významnou roli i v jiných orgánech. V ledvině reguluje akutní i chronické zánětlivé odpovědi (Reeves, Kwon et al. 2008, Ramesh, Kwon et al. 2010). Je přímou cílovou molekulou HIF1 dráhy (Rosenberger, Schwab et al. 2009). Parciální deficiencie (*Ntn-1*^{+/-}) vedla ke zhoršení průběhu DN, kdy došlo k poškození funkce ledvin po vystavení jedince působení *diabetes mellitus*, byla zjištěna albuminurie a snížená clearance. Z histologického hlediska došlo ke zvětšení plochy glomerulů a zhoršení histologického obrazu (Carney 2012, Mohamed, Jayakumar et al. 2012, Tak, Ridyard et al. 2013). Netrin-1 je negativním regulátorem apoptózy, má antiapoptický účinek (Wang, Reeves et al. 2009).

2. Cíle práce

Diabetická nefropatie je nejčastější příčinou konečného selhání ledvin. Vzniká v důsledku dlouhodobé hyperglykemie, která stimuluje řadu alternativních procesů, jenž vedou ke vzniku hypoxie/pseudohypoxie v ledvinách. Hlavním buněčným regulátorem na toto stresové prostředí je transkripční faktor HIF1 α . Cílem této práce je přispět k objasnění funkční role HIF1 α signální dráhy v rozvoji DN s využitím myšího modelu s funkční deficiencí HIF1 α .

Specifické cíle:

- Histologickou analýzou zhodnotit morfologické změny v ledvinné tkáni *wt* a heterozygotního mutantu *Hif1 α ^{+/-}* a určit úroveň apoptózy v ledvinné tkáni.
- Určit hladinu exprese cílových genů HIF1 α signální dráhy (*Agtr1a*, *Bmp7*, *Ctgf*, *Ntn1*, *Sox9*, *Tgfb1*, *Vegfa* a *Wt1*).
- Určit míru exprese VEGFA a WT1 v glomerulech. A zhodnotit hladinu HIF1 α v ledvinné kůře.

3. Materiál

3.1 Komerční soupravy

- Chemiluminiscenční substrát („Clarity Western Substrate“), *Bio-Rad, Hercules (USA)*
- Chemiluminiscenční substrát („SuperSignal West Femto Trial Kit“), *Thermo Scientific, Massachusetts (USA)*
- Komerční souprava pro detekci apoptických oblastí („In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“), *Roche, Indianapolis (USA)*
- Komerční souprava pro detekci polysacharidů („Periodic Acid-Schiff Kit“), *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*
- Komerční souprava pro extrakci nukleárních proteinů („Nuclear Extract Kit“), *Active Motif, Carlsbad (USA)*
- Komerční souprava pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci („SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™“), *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*
- Komerční souprava pro polymerázovou řetězovou reakci („JumpStart™ Taq DNA Polymerase“), *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*
- Komerční souprava pro stanovení koncentrace proteinu („Protein Assay Kit II“), *Bio-Rad, Hercules (USA)*
- Komerční souprava pro syntézu cDNA („RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit“), *Thermo Scientific, Massachusetts (USA)*

3.2 Primery

Primery byly navrženy pomocí Primer-BLAST (Ye, Coulouris et al. 2012), Primery byly vybrány podle následujících parametrů: délka primeru 18 – 24 bází, teplota tání mezi 58 °C a 60 °C a obsah C a G mezi 40-60%. Seznam použitých primerů je uveden v následující tab.1.

Tab.1: Seznam použitých primerů pro kvantitativní polymerasovou řetězovou reakci.

Gen	Sekvence (5' → 3')
<i>Agtr1a-F</i>	AAGCCTTAGGGTTGGAACCTG
<i>Agtr1a-R</i>	CATCCAGTCCCTCCCAACTG
<i>Ctgf-F</i>	AGACCTGTGCCTGCCATTAC
<i>Ctgf-R</i>	ACGCCATGTCTCCGTACATC
<i>Hprt1-F</i>	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG
<i>Hprt1-R</i>	CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
<i>Ntn1-F</i>	TTGCAAAGCCTGTGATTGCC
<i>Ntn1-R</i>	AATCTTGATGCAAGGGGCGA
<i>Sox9-F</i>	AAGAAAGACCACCCCGATTACA
<i>Sox9-R</i>	CAGCGCCTTGAAGATAGCATT
<i>Tgfβ1-F</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAA
<i>Tgfβ1-R</i>	ATGTCATGGATGGTGCCCAG
<i>Vegfa-F</i>	ACTGGACCCTGGCTTTACTG
<i>Vegfa-R</i>	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC
<i>Wt1-F</i>	CACGGCACAGGGTATGAGAG
<i>Wt1-R</i>	GTTGGGGCCACTCCAGATAC

(F- z anglického „forward“, R- z anglického „reverse“)

3.3 Chemikálie

Sigma-Aldrich, Missouri (USA)

agarosa, DPX „Mountant for histology“, ethidium bromid, isopropanol, streptozocin (STZ), disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), dimehtylsulfoxid (DMSO), Ponceau, 20mM citrátový pufr, voda bez DNas a RNas, paraformaldehyd (PFA), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris), hovězí sérový albumin (BSA), Hoechst 33258 (2'-(4-hydroxyfenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazoltrihydrochlorid), N-propylgalát, glycin

Thermo Scientific, Massachusetts (USA)

dNTP Mix (10mM), DNA žebříček 50pb („GeneRuler 50 bp DNA Ladder“)

Bamed, České Budějovice (ČR)

„eosin G o Y“ ethanolový roztok, hematoxylin

Bio-Rad, Hercules (USA)

30% roztok akrylamid (akrylamid/bisakrylamid(29:1)), peroxodisíran amonný (APS), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), sušené mléko, Laemmli vzorkovací pufr, proteinový standard WesternC™

Invitrogen, Carlsbad (USA)

RediLoad™, Trizol® Reagent

Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha (ČR)

ethylaklohol, chlorid sodný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, kyselina octová, methanol, xylén

Amresco, Solon (USA)

Tween® 20, glycerol, kyselina boritá, dodecylsulfát sodný (SDS)

Jackson ImmunoResearch, Baltimore (USA)

kozí sérum

3.4 Enzymy

Proteinasa K (20 mg/ml), *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*, RNasa H (5 U/μl), *Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)*, DNasa I (1 U/μl), *Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)*

3.5 Protilátky

Primární protilátky

VEGF (C-1) (myší IgG2a, monoklonální, katalogové číslo: sc-7269, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)*)

WT1 (králíčí IgG, polyklonální, katalogové číslo: CA1026, *Merck Millipore, Billerica (USA)*)

HIF1α (HIFalpha67) (myší IgG2a, monoklonální, katalogové číslo: NB100-105, *Novusbiologicals, Littleton (USA)*)

Sekundární protilátky

DyLight488-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (kozí, katalogové číslo: 205-485-108, *Jackson ImmunoResearch, Baltimore (USA)*)

DyLight494-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (kozí, katalogové číslo: 205-515-108, *Jackson ImmunoResearch, Baltimore (USA)*)

Anti-Mouse IgG-Peroxidasa (králíčí, katalogové číslo: A9044, *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*)

3.6 Složení použitých roztoků

Antifade (21,2% (w/v) N-propylgalát, 0,2M Tris pufr pH = 8, 90% (v/v) glycerol)

Barvicí roztok Ponceau (0,1% (v/v) ponceau v 1% (v/v) kyselině octové)

Tris-kys.boritá-EDTA pufr (TBE) (45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH = 8,0)

Tris-glycin-SDS pufr (elektroforetický pufr) (25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný, pH = 8,3)

Lyzační pufr (50mM Tris, 100mM EDTA, 100mM chlorid sodný, 1% (w/v) dodecylsulfát sodný, pH = 8,0)

Fosfátový pufr (PBS) (10mM hydrogenfosforečnan sodný, 150mM chlorid sodný, 2mM chlorid draselný, 2mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH = 7,4)

Tris-glycinový pufr (přenosový pufr) (25mM Tris, 192mM glycin, 20% (v/v) methanol, pH = 8,3)

Tris-NaCl-Tween[®]20 pufr (TBST) (50mM Tris, 150mM chlorid sodný, 0,05% (v/v) Tween[®]20, pH = 7,6)

3.7 Polyakrylamidové gely

Tab.2: Složení 10% separačního a zaostřovacího gelu.

Složky	zaostřovací gel [ml]	10% separační gel [ml]
voda	2,1	4
30% akrylamidový roztok ((akrylamid/bisakrylamid(29:1))	0,5	3,3
1,5M Tris (pH = 8,8)	-	2,5
1M Tris (pH = 6,8)	0,38	-
10% (v/v) dodecylsulfát sodný	0,04	0,1
10% (v/v) peroxodisíran amonný	0,04	0,1
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	0,003	0,004

3.8 Laboratorní přístroje a zařízení

Analytické váhy 154AI, *Bel engineering, Monza (IT)*

Centrifuga Z216 MK (stolní, chlazená), *Hermle, Gosheim (DE)*

Elektrická ploténka OTS 40, *Medite, Orlando (USA)*

Elektrický zdroj PowerPac Basic, *Bio-Rad, Hercules (USA)*

Elektroforéza Mini Gel System B1, *Thermo Scientific, Massachusetts (USA)*

Fluorescenční Mikroskop Eclipse 400, *Nikon, Tokyo (J)*

Fotoaparát SP- 565 UZ, *Olympus, Tokyo (J)*

Glukometr Contour TS, *Bayer, Barmen (DE)*

Homogenizátor TissueRuptor, *Qiagen, Hilden (DE)*

Hybridizační pec ProBlot, *Labnet, Edison (USA)*

ImageQuant LAS 4000, *GE Healthcare and Life Science, Uppsala (S)*

Konfokální mikroskop TCS SPE, *Leica, Wetzlar (DE)*

Microtome Leica RM2255, *Leica, Wetzlar (DE)*

Mikroskop Eclipse 50i, *Nikon, Tokyo (J)*

Mikrovlnná trouba MCE30, *Hitachi, Tokyo (J)*

Orbitální kývačka Orbit LS Low Speed, *Labnet, Edison (USA)*

Pipety P39604P, *Gilson, Labnet, Edison (USA)*

Spektrofotometr ND1000, NanoDrop, *Thermo Scientific, Massachusetts (USA)*

Stereomikroskop SMZ 1500, *Nikon, Tokyo (JP)*

Stolní centrifuga Combi-Spin FVL-2400N, *Biosan, Warren (USA)*

Stolní míchačka MIXER S0200, *Labnet, Edison (USA)*

Systém pro zobrazení a kvantifikaci agarosových gelů UVT-28M, *Herolab/Olympus, Wiesloch (DE)/Tokyo (J)*

Termoblok BioTDB-100, *Labnet, Edison (USA)*

Termocycler CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, *Bio-Rad, Hercules (USA)*

Termocycler CFX96Touch™ Real-Time PCR Detection System, *Bio-Rad, Hercules (USA)*

Termocykler BIOER, *Genepro, Atlanta (USA)*

Termostat Mini Incubator 5110-230V, *Labnet, Edison (USA)*

Vertikální elektroforéza Mini PROTEAN® Tetra system, *Bio-Rad, Hercules (USA)*

Vodní lázeň NB-303, *N-Biotek, Bucheon (KR)*

pozn. veškeré použité laboratorní nádobí i roztoky jsou sterilní a bez RNas a DNas

3.9 Ostatní materiál

Nitrocelulosová membrána 0,45 µm, *Bio-Rad, Hercules (USA)*

PapPen, *Sigma-Aldrich, Missouri (USA)*

Podložní skla Superfrost®Plus, *Thermo Scientific, Massachusetts (USA)*

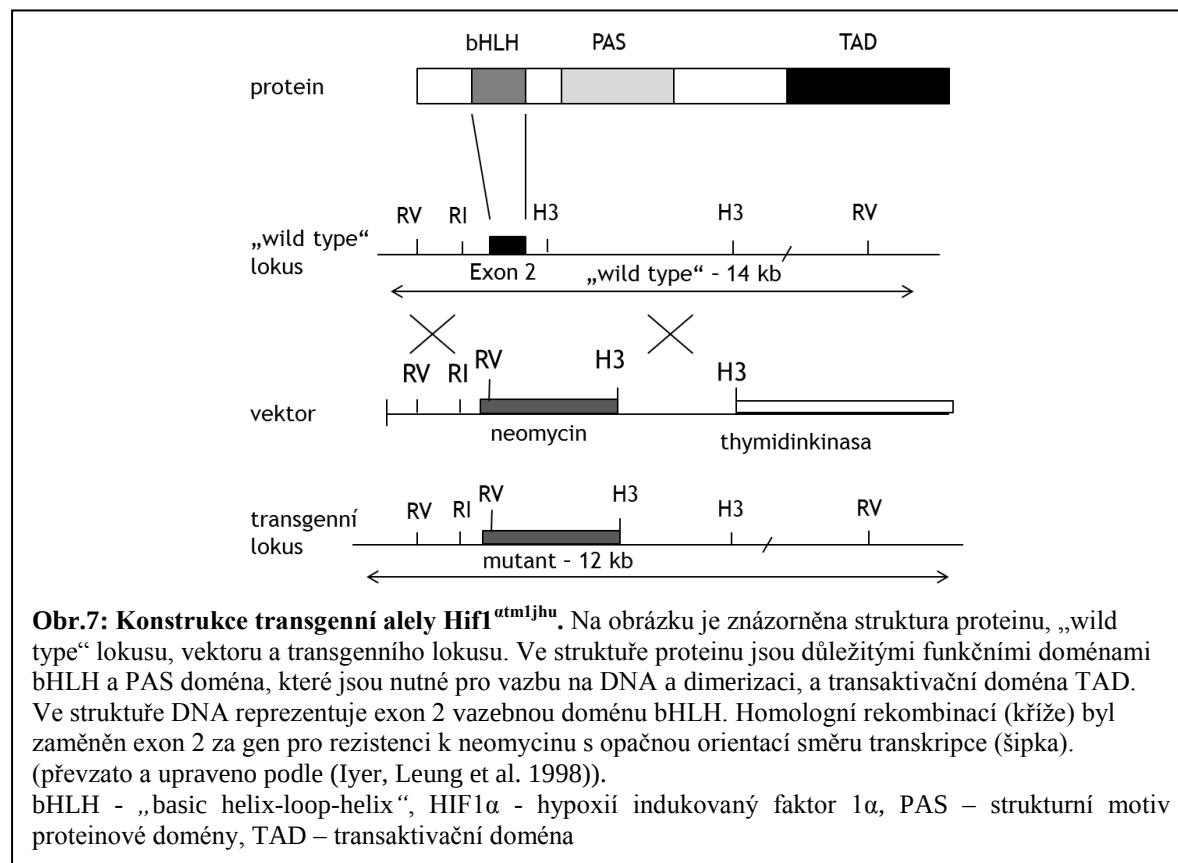
4. Metody

4.1 Experimentální myš model

Charakteristika modelového organismu

Experimentální práce se zvířaty proběhla v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 419/2012 Sb. K pokusům byli použiti myši samci inbredního FVB kmene (číslo 207, *Charles River, USA*) ve věku 7-9 týdnů. Křížením jedinců divokého kmene (z anglického „wild type“ (wt, *Hif1α*^{+/+})) s heterozygotními mutanty *Hif1α*^{+/-} s *Hif1α*^{tm1jhu} vyřazenou alelou (Iyer, Leung et al. 1998) na FVB geneticky definovaném pozadí byly generovány *Hif1α*^{+/-} a wt myši.

Konstrukce transgenní alely je zobrazena na obr.7. Virovým vektorem byl exon 2 *Hif1α* nahrazen genem pro rezistenci k neomycinu. Rekombinantní protein neobsahuje bHLH DNA vazebnou doménu, tudíž nemůže plnit funkci transkripčního faktoru. Heterozygotní *Hif1α*^{+/-} deficientní myši byly získány od Gregga L. Semenzy z Johns Hopkins University School of Medicine, USA. Mutace byla detekována pomocí genotypizace.



Izolace DNA a určení genotypu

Každý vrh nově narozených myší bylo nutné genotypovat, aby byli odděleni heterozygotní mutanti *Hif1 α ^{+/-}* od wt. Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) z izolované DNA myších jedinců.

Pro izolaci DNA byly použity cca 2 mm ocasu každého jedince, získaná tkáň byla lyzována a ze získaného lyzátu byla srážena DNA. Nejprve byla tkáň přenesena do mikrozkuavek a bylo přidáno 600 μ l lyzačního pufru a 12,5 μ l proteinasy K (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Takto připravené vzorky byly umístěny do rotační hybridizační pece ProBlot (Labnet, Edison, USA) a byly inkubovány přes noc při 55 °C. Lyzované vzorky byly promíchány a poté centrifugovány (Hermle, Gosheim, DE) 10 min/14000 g, 20 °C. Supernatant byl přenesen do sterilní mikrozkuavky a bylo přidáno 600 μ l isopropanolu. Pomalým převrácením mikrozkuavky bylo docíleno vysrážení DNA. Peleta DNA byla odsolena přidavkem 500 μ l 70% (v/v) ethanolu a poté vysušena v inkubátoru (Labnet, Edison, USA) při teplotě 37 °C po dobu 20 min. Peleta DNA byla rozpuštěna ve 100 μ l vody v termostatu při 55 °C.

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (při vlnové délce 260 nm) pomocí spektrofotometru ND1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Amplifikace DNA byla provedena v celkovém reakčním objemu 25 μ l za použití komerční soupravy „JumpStartTM Taq DNA Polymerase“ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.3 a jednotlivé reagenty jsou uvedeny v tab.4., str. 39.

Tab.3: Nukleotidová sekvence primerů pro genotypizaci.

Gen	Sekvence (5' → 3')
<i>Hif1α-F</i>	TGTAGTCTCCTGCTAAAAG
<i>Hif1α-R</i>	TTATTCGAGTTAAGACAAAC

(F- z anglického „forward“, R- z anglického „reverse“)

Tab.4: Složení PCR reakční směsi.

Složka	V [μl]
10x PCR pufr	2,5
MgCl ₂ (15 mM)	1,5
dNTP (10 mM)	0,5
Rediload™	2,5
primer F(10 μM)	1
primer R(10 μM)	1
DMSO	1,25
„JumpStart TagDNA Polymerasa“ (2,5 U/μl)	0,15
voda	13,5
DNA	1,0

Reakce byla provedena v zařízení termocykler BIOER (*Genepro, Atlanta, USA*) dle schématu, který je uveden v tab.5.

Tab.5: Schéma PCR reakce.

Krok	Teplota [°C]	Doba [min]	Opakování
aktivace polymerasy	95	5	1
denaturace DNA	95	0,5	34
nasedání primerů	63	0,5	34
elongace	72	0,5	34
konečná elongace	72	5	1

Rozdělení produktů PCR reakce bylo provedeno elektroforeticky (*Thermo Scientific, Massachusetts, USA*) v TBE pufru na 2% (w/v) agarosovém gelu s přidavkem ethidium bromidu (0,01 μl/ml). Elektrofóréza probíhala při konstantním napětí 130 V po dobu 20 min. Výsledný gel byl dokumentován s využitím systému pro zobrazení a kvantifikaci agarosových gelů UVT-28M (*Herolab/Olympus, Wiesloch, DE/Tokyo, J*) a fotoaparátu Olympus SP- 565 UZ (*Olympus, Tokyo, J*).

Indukce diabetes mellitus

Diabetes mellitus byl navozen pomocí látky streptozocin (STZ). STZ byl rozpuštěn v 10 mM citrátovém pufru a injikován intraperitoneálně (100 mg/kg) ve dvou dávkách po týdnů. Dva týdny po aplikaci první dávky STZ byla zmeřena hladina glukosy. Za diabetické jedince byli považováni ti, u nichž byla hladina glukosy větší nebo rovna 13,9 mmol/l. Jedinci byli vystaveni *diabetes mellitus* po dobu 5 týdnů.

Odběr ledvin

Ledviny byly odebírány jedincům po předchozí perfúzi orgánů pomocí PBS. Ledviny byly použity na přípravu parařinových preparátů, pro izolaci proteinů a pro izolaci RNA. Ledviny, které byly použity pro přípravu parařinových preparátů, byly fixovány 24 h/4 °C ve 4% (w/v) PFA v PBS pufru. Ledviny, ze kterých byla izolována RNA, nebo proteiny, byly mikroskalpelem rozděleny na kůru a dřeň. Z těchto částí byla následně izolována požadovaná složka. Metody izolace jsou uvedeny v dalším textu.

4.2 Izolace RNA

Ke tkáni byl přidán 1 ml „Trizol®Reagent“ (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). Po homogenizaci elektrickým homogenizátorem byly vzorky 10 min inkubovány při laboratorní teplotě. Ke zhomogenizované tkáni byl přidán chloroform (1/5 objemu „Trizol®Reagent“), následovala inkubace vzorků 5 minut při laboratorní teplotě a poté byly vzorky centrifugovány 15 min/14000 g, 4°C. Do nové mikrozkuřavky byla odebrána vodná fáze a po přidání isopropanolu (1/2 objemu „Trizol®Reagent“) byla srážena RNA. Následně byly vzorky centrifugovány 15 min/14000 g, 4 °C. Omytí pelet bylo zajištěno přidáním 0,5 ml 75% (v/v) ethanolu. Sedimentace pelet byla zajištěna centrifugací 5 min/7500 g, 4 °C. Pelety RNA byly omyty celkem třikrát. Na závěr byl ethanol odlit a pelety byly sušeny v inkubátoru při 37 °C po dobu 20 min.

RNA izolovaná z kůry byla rozpuštěna ve 100 µl a z dřeň v 50 µl vody. Po rozpuštění byla degradována zbylá DNA, přidáním 1 µl Dnasy I (1 U/µl) (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA*), následně byly vzorky v termobločku zahřáty na 37 °C po dobu 30 min, poté byly zahřáty na 65 °C po dobu 10 min. Takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C.

4.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí komerční soupravy „RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit“ (*Thermo Scientific, Massachusetts, USA*), bylo postupováno dle protokolu výrobce. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky (při vlnové délce 260 nm) pomocí spektrofotometru ND1000. Byl přepsán 1 µg RNA do cDNA. K 10 µl RNA (0,1 µg/µl) byl přidán 1 µl primeru oligo(dT)₁₈ (100 µM) a 1 µl primeru náhodných hexamerů (100 µM). Reakční směs byla inkubována v termocykleru BIOER při 65 °C po dobu 5 min. Vzorby byly následně ochlazeny na ledu a byly přidány 4 µl 5x reakčního pufru, 1 µl „RiboLock RNasy Inhibitoru“ (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) a 1 µl „RevertAid H Minus M-MuLV Reverzní Transkriptasy“ (200 U/µl). Vlastní reakce byla provedena v termocykleru BIOER nejprve při 42 °C po dobu 60 min, poté 5 minut při 70 °C. Zbytky RNA byly degradovány přidavkem 0,6 µl RNasy H (5 U/µl) (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA*) za inkubace při 37 °C po dobu 20 min v termobločku. Vzorby cDNA byly uchovány při -80 °C.

4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase byla provedena s využitím komerční soupravy „SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™“ (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) bylo postupováno dle protokolu výrobce. cDNA byla nejprve naředěna vodou (1:19). Takto připravená cDNA byla použita jako templát pro qPCR. Reakce byla provedena v celkovém objemu 10 µl. Reakční směs byla složena ze 4 µl cDNA, 0,25 µl primeru F (10 µM), 0,25 µl primeru R (10 µM), 0,5 µl vody a 5 µl „Syber®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™“. Použité sady primerů jsou uvedené v tab.1, str. 31.

Reakce byla provedena buď v přístroji CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection Systém (*Bio-Rad, Hercules, USA*) nebo CFX96Touch™ Real-Time PCR Detection Systém (*Bio-Rad, Hercules, USA*) dle schématu, které je uvedené v tab.6.

Tab.6: Schéma qPCR.

Krok	Teplota [°C]	Doba [s]	Počet opakování
aktivace polymerasy	94	120	1
denaturace	94	15	39
nasedání primerů	60	30	39
elongace	72	30	39
kontrola křivek tání	65 - 95	krok po 0,5 °C za 5 s	-

Zpracování výsledků qPCR

Hodnoty Cq („quantification cycle“) byly určeny pomocí počítačového programu CFX Manager™, (Bio-Rad, Hercules, USA), metodou druhé derivace. Z těchto hodnot byla vypočtena průměrná hodnota Cq jednotlivých technických replikátů. Tato hodnota byla normalizována ke kontrolnímu genu – byl zvolen gen *Hprt1* (z anglického „hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase“) podle rovnice (1).

$$\Delta Cq = Cq_{\text{GEN}} - Cq_{\text{Hprt1}} \quad (1)$$

(ΔCq – normalizovaná hodnota Cq sledovaného genu, Cq_{GEN} - hodnota Cq sledovaného genu, Cq_{Hprt1} - hodnota Cq kontrolního genu)

Dále bylo vypočteno $\Delta\Delta Cq$ podle vzorce (2).

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \text{průměr}(\Delta Cq_{\text{kontrola}}) \quad (2)$$

(ΔCq - normalizovaná hodnota Cq sledovaného genu dané skupiny, $\text{průměr}(\Delta Cq_{\text{kontrola}})$ – průměrná hodnota ΔCq kontrolní skupiny (wt kontrola))

Relativní exprese sledovaného genu byla vypočtena metodou $E^{-\Delta\Delta Cq}$ pomocí jeho efektivity (E) při qPCR a jeho diferenci (Δ) přechodového bodu (Cq) experimentálního vzorku vůči kontrole dle rovnice (3) (Livak and Schmittgen 2001).

$$\text{Relativní exprese} = E^{-\Delta\Delta Cq} \quad (3)$$

(E - efektivita)

Efektivita byla vyhodnocena metodou lineární regrese pomocí počítačového programu LinRegPCR 2013.0, (Ruijter et al., Amsterdam, NL).

Takto získané hodnoty byly statisticky vyhodnoceny metodou dvoucestné analýzy rozptylu, kdy byly sledovány dva parametry (onemocnění, genotyp) - („two-way ANOVA“) a dodatečným nepárovým dvouramenným *t*-testem. Každá skupina (kontrolní wt, diabetický wt, kontrolní *Hif1 α ^{+/-}*, diabetický *Hif1 α ^{+/-}*) obsahovala 5-8 jedinců.

4.5 Izolace proteinů

Izolace jaderné frakce

Ledvina byla rozdělena na kůru a dřev. Izolace jaderné frakce byla provedena pomocí komerční soupravy „Nuclear Extract Kit“ (*Active Motif, Carlsbad, USA*). Při izolaci bylo postupováno dle protokolu výrobce. Během izolace byly vzorky uchovávány při 4 °C, stejně tak i inkubace v jednotlivých krocích izolace byly prováděny při této teplotě. Jednotlivé části ledvinové tkáně byly zváženy a přeneseny do vychlazených mikrozkušavek. Ke tkáni byl přidán hypotonický pufr (3 ml/g tkáně) a DTT (3 µl/g tkáně). Následně byla tkáň homogenizována (*Qiagen, Hilden, DE*) a inkubována 15 min. Dále byl homogenát centrifugován 10 min, 850 g při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky. K peletě bylo přidáno 500 µl hypotonického pufru a následovala inkubace 15 min. Po přidání 25 µl detergentu byl roztok intenzivně míchán na stolní míchačce (*Labnet, Edison, USA*) po dobu 15 s. Dále byly vzorky centrifugovány 30 s, 14000 g při 4 °C. Supernatant byl přidán k dříve odebranému supernatantu a takto byla získána cytoplazmatická frakce proteinů, která byla uchovávána při -80 °C. K peletě bylo přidáno 50 µl kompletního lyzačního pufru, a následně byla resuspendována mícháním po dobu 10 s na stolní míchačce. Poté byly vzorky inkubovány 30 min na orbitální kývačce (*Labnet, Edison, USA*) při 150 otáčkách za min. Po skončení inkubace byly vzorky 30 s míchány a dále centrifugovány 10 min, 14000 g při 4 °C. Supernatant byl rozdělen po 10 µl do nových mikrozkušavek a byl uchováván při -80 °C.

4.6 Přenos a imunochemická detekce proteinů

Elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Nejprve byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE. V jaderné frakci byla změřena koncentrace proteinů pomocí „Protein Assay Kit II“ (*Bio-Rad, Hercules, USA*), bylo postupováno dle protokolu výrobce. Koncentrace proteinů byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm pomocí činidla Coomassie® Brilliant Blue G-250 podle Bradfordové (Bradford, M. M., 1976). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) (*Bio-Rad, Hercules, USA*). K 60 µg proteinu v 10 µl bylo přidáno 10 µl Laemmli vzorkovacího pufru (*Bio-Rad, Hercules, USA*). Takto připravené vzorky byly zahřáty na 99 °C po dobu 5 min, poté byly ochlazeny na 4 °C. Dále byla připravena elektroforetická aparatura Mini PROTEAN® Tetra systém (*Bio-Rad, Hercules, USA*). Na gel byly naneseny vzorky a komerční proteinový standard (*Bio-Rad, Hercules, USA*). Rozdělení proteinů probíhalo při 200 V po dobu 2 h.

Přenos a imunochemická detekce HIF1α („western blot“)

Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu byl proveden v prostředí přenosového pufru při 30 V po dobu 2 h v aparatuře Mini PROTEAN® Tetra systém. Po přenosu byla membrána obarvena barvicím roztokem Ponceau (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) a zdokumentována. Toto barvení slouží ke kontrole přenosu proteinů na membránu. Po dokumentaci byl barvicí roztok z membrány omyt oplachem v TBST (třikrát po dobu 10 min). Dále byla membrána blokována po dobu 60 min v roztoku 5% (w/v) mléka v TBST. Po blokaci byla membrána inkubována přes noc s primární protilátkou při 4 °C (1:750 HIF1α (*Novusbiologicals, Littleton, USA*) v 5% (w/v) BSA v TBST). Poté byla membrána třikrát oplachována po dobu 10 min při 4 °C. Následovala inkubace se sekundární protilátkou (1:10000 „Anti-Mouse IgG-Peroxidasa“ (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) v 1% (w/v) mléku v TBST) po dobu 60 min při 4 °C, poté byla třikrát oplachována po dobu 10 min v TBST. Po ukončení omývání bylo na membránu naneseno 750 µl chemiluminiscenčního substrátu komerční soupravy „SuperSignal West Femto Trial Kit“ (*Thermo Scientific, Massachusetts, USA*), bylo postupováno dle protokolu výrobce. Chemiluminiscenční signál byl detekován a zdokumentován pomocí LAS4000 (*GE Healthcare and Life Science, Uppsala, S*). Chemiluminiscenční signál byl vyhodnocen

denzitometricky v počítačovém programu ImageJ 1.47V (*Rasband, W, National Institute of Health, USA*). Jako kontrola množství proteinů, které bylo nanášeno na gel, bylo použito barvení Ponceau (Romero-Calvo, Ocon et al. 2010, Gilda a Gomes 2013). Denzitometricky byly hodnoceny proteiny o velikosti 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa a 50 kDa. Takto získané hodnoty byly sečteny, tento součet byl použit k normalizaci množství proteinu, které bylo nanášeno na gel. Hodnota pozitivního signálu HIF1 α byla vztažena k tomuto součtu. Takto získaná data byla statisticky vyhodnocena metodou dvoucestné analýzy rozptylu s následným nepárovým *t*-testem.

4.7 Histologická analýza

Příprava řezů

Ledviny po fixaci ve 4% (w/v) PFA v PBS byly důkladně omyty v PBS pufru. Poté byly vzorky převedeny do 70% (v/v) ethanolu pomocí ethanolové řady (25% (v/v), 50% (v/v) a 70% (v/v) ethanol). Pro převedení vzorků do xylenu a prosycení parafinem byl použit odvodňovací tkáňový automat Leica ASP 200. Takto připravené vzorky byly zality do parafinu pomocí zalévacího automatu Leica EG 1150 (*Leica, Wetzlar, DE*). Histologické řezy o tloušťce 8 μm byly připraveny pomocí Microtomu Leica RM2255 (*Leica, Wetzlar, DE*). Jednotlivé řezy byly přeneseny z vodní lázně (*N-Biotek, Bucheon, KR*), která měla teplotu 39 °C, na podložní skla (*Thermo Scientific, Massachusetts, USA*) se speciálně ošetřeným povrchem zajišťujícím dokonalou adhezi řezů na skla. Konečná fixace řezů na sklech byla provedena inkubací při 42 °C po dobu 2 h.

Pro další práci s připravenými řezy bylo nutno nejprve preparáty zbavit parafinu postupem uvedeným v tab.7.

Tab.7: Schéma odparafinování řezů.

Číslo kroku	Činidlo (% v/v)	Doba setrvání v lázni [min]
1	xylén	15
2	100% ethanol	5
3	96% ethanol	5
4	90% ethanol	5
5	80% ethanol	3
6	70% ethanol	3
7	destilovaná voda	∞

Histologické barvení

Reakce kyseliny jodisté a Schiffova činidla

Tato reakce byla provedena za použití komerční soupravy „Periodic Acid-Schiff Kit“ (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*) a bylo postupováno dle protokolu výrobce. Řezy byly nejprve zbaveny parafínu a převedeny do deionizované vody. Činidla byla na řezy nanášena dle postupu uvedeném v tab.8.

Tab.8: Postup reakce kyseliny jodisté a Schiffova činidla.

Číslo kroku	Činidlo	Doba	Opakování
1	kyselina jodistá	5 min	1
2	destilovaná voda	5 min	3
3	Schiffovo činidlo	15 min	1
4	tekoucí voda	5 min	1
5	hematoxylin	90 s	1
6	70% ethanol	10 s	1
7	80% ethanol	10 s	1
8	90% ethanol	10 s	1
9	96% ethanol	10 s	1
10	100% ethanol	5 min	1
11	xylén	3 min	1
12	xylén	3 min	1

Po odvodnění tkání (krok 6 až 12) byly připraveny trvalé preparáty. Na řezy bylo nanášeno médium DPX a byly překryty krycím sklem.

Imunohistochemické barvení

VEGFA a WT1

Řezy na sklech byly nejprve zbaveny parafinu a prosyceny PBS pufrům. Kvůli odkrytí specifických epitopů byly odparafinované řezy vařeny 20 min v 10mM citrátovém pufru. Po ukončení varu a ochlazení byla skla s řezy inkubována 5 min v PBS pufru při laboratorní teplotě. Následně byl na řezy nanesen blokační roztok (2% (w/v) kozího séra (*Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA*) v PBS pufru, 1% (w/v) BSA v PBS pufru). Blokace probíhala 90 min při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byl na řezy nanesen roztok primárních protilátek (1:50 VEGFA (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA*), 1:200 WT1 (*Merck Millipore, Billerica, USA*), 2% (w/v) kozí sérum, 1% (w/v) BSA, 0,01% (v/v) Tween[®]20 v PBS). S primárními protilátkami byly řezy inkubovány přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce. Řezy byly omyty v PBS pufru třikrát po dobu 15 min. Následovala inkubace ve vlhké komůrce za tmy s fluorescenčně značenými sekundárními kozími protilátkami po dobu 60 min. (1:200 „DyLight488-conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (*Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA*), 1:200 „DyLight494-conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (*Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA*), 2% (w/v) kozí sérum, 1% (w/v) BSA, 0,01% (v/v) Tween[®]20 (*Amresco, Solon, USA*) v PBS). Po inkubaci byly řezy omyty v PBS třikrát po dobu 5 min. Pro barvení jader bylo použito fluorescenční barvivo Hoechst 33258 (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*). Řezy byly inkubovány s tímto barvivem po dobu 15 min a poté byly omyty PBS pufrům třikrát po dobu 15 min. Veškeré omývací kroky PBS pufrům byly prováděny při laboratorní teplotě za použití orbitální třepačky nastavené na 75 ot/min. Na takto připravené řezy bylo nanášeno medium stabilizující fluorescenci – antifade ((21,2% (w/v) N-propylgalát, 0,2M Tris pufr pH = 8, 90% (v/v) glycerol) a po překrytí řezů krycím sklem, byly vytvořeny trvalé preparáty. Preparáty byly zobrazeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Eclipse 400 (*Nikon, Tokyo, J*) nebo konfokálního mikroskopu TCS SPE (*Leica, Wetzlar, DE*), dále byly fotograficky dokumentovány pomocí kamery. Fotografie byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí počítačových programů ImageJ 1.47V, kdy byla určena celková plocha pozitivního signálu v glomerulu. Plocha pozitivního signálu byla vztažena k celkové ploše glomerulu. Bylo hodnoceno 5 jedinců z každé skupiny wt kontrol, diabetických wt, *Hif1α*^{+/-} kontrol a diabetických *Hif1α*^{+/-} u každého jedince bylo porovnáno 10 glomerulů. Takto získaná data byla statisticky vyhodnocena.

Detekce úrovně apoptózy metodou TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“)

Tato metoda byla provedena pomocí komerční soupravy „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche, Indianapolis, USA), bylo postupováno dle protokolu výrobce. Řezy byly nejprve zbaveny parafinu a převedeny do PBS. Dále byl na řezy nanesen roztok Proteinasy K (20 µg/ml) v 10mM Tris-HCl pufru (pH = 8), tímto enzymem bylo zajištěno narušení struktury tkáně. Vzorky byly s Proteinase K inkubovány 20 min při 37 °C ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly řezy třikrát omyty v PBS po dobu 10 min. Byl vybrán řez, který sloužil jako pozitivní kontrola. Tento řez byl na skle ohraničen pomocí PapPenu a byl vystaven působení DNasy I (1 U/µl), pomocí které byly indukovány zlomy vláken DNA. Řez byl s DNasou I inkubován po dobu 12 min při laboratorní teplotě, ostatní řezy byly překryty roztokem PBS. Následovalo omytí řezů dvakrát v PBS po dobu 15 min. Po omytí byla na řezy nanesena směs roztoků komerční soupravy (terminální deoxynukleotidyltransferasy a fluorescenčně značeného dUTP v poměru 1:10). V případě negativní kontroly, která byla opět ohraničena pomocí PapPenu, byl na řez nanesen pouze roztok fluorescenčně značeného dUTP bez přidání terminální deoxynukleotidyltransferasy. Řezy byly inkubovány ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu jedné hodiny. Po inkubaci byly řezy třikrát omyty v PBS po dobu 5 min. Pro barvení jader bylo použito fluorescenční barvivo Hoechst 33258, řezy byly inkubovány s tímto barvivem po dobu 15 min a poté byly omyty PBS pufrům třikrát po dobu 15 min. Po omytí bylo na řezy naneseno medium stabilizující fluorescenci - antifade, a po překrytí řezů krycím sklem byly vytvořeny trvalé preparáty. Preparáty byly dokumentovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Eclipse 400 a kamery. Pozitivní buňky byly spočítány a jejich množství bylo vztaženo k celkové ploše tkáně. Takto získaná data byla statisticky vyhodnocena metodou dvoucestné analýzy rozptylu s následným nepárovým *t*-testem.

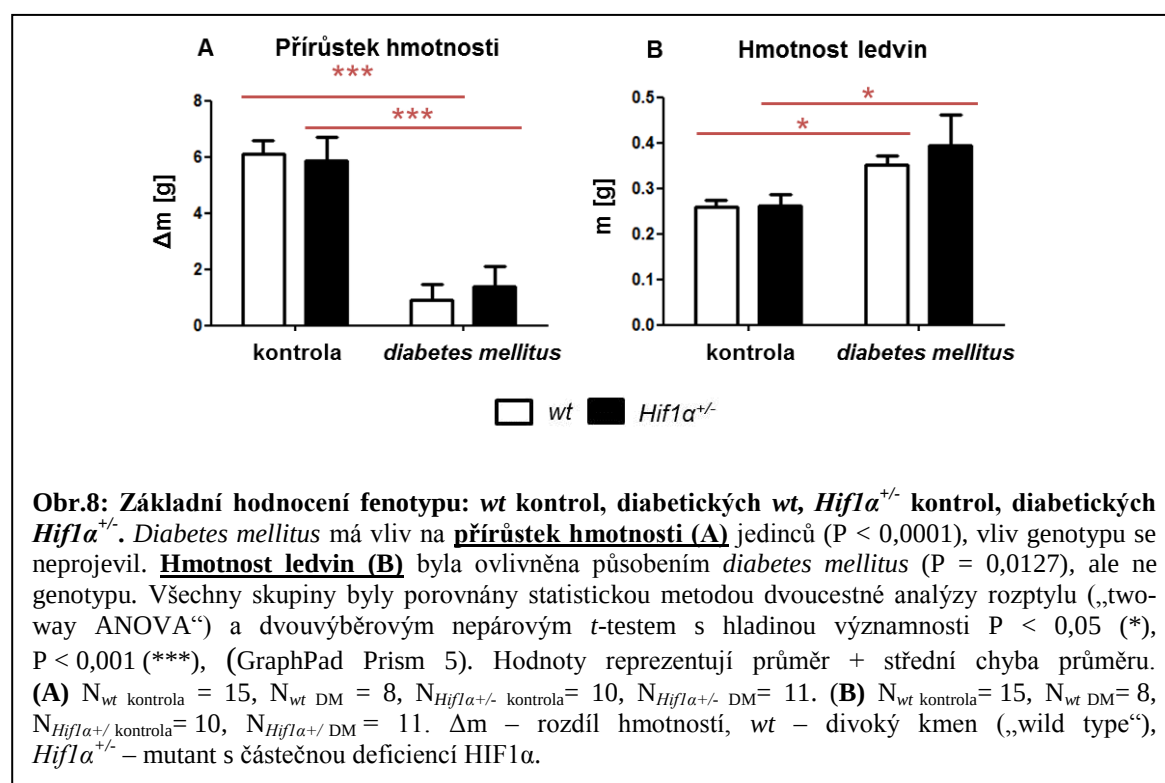
4.8 Statistické metody

Statistická analýza byla provedena v počítačovém programu GraphPad Prism 5, (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*). Pro statistické vyhodnocení dat byla použita dvoucestná analýza rozptylu. Pomocí této statistické metody bylo možné sledovat vliv více faktorů najednou. Byly sledovány dva faktory: **1) částečná deficience HIF1 α** a **2) *diabetes mellitus***. Dále bylo možné sledovat vzájemné působení těchto dvou faktorů na skupinu jedinců, tedy zda byli daní jedinci ovlivněni společným efektem mutace s onemocněním. Toto působení bylo stejnosměrné nebo nestejnosměrné, v případě nestejnosměrného působení faktorů byla sledována interakce jednotlivých faktorů. V tomto případě nebylo možno odlišit, který z faktorů byl rozhodující. Pokud u některého z faktorů byl prokázán statisticky významný vliv nebo byla prokázána interakce, byl proveden dvouramenný *t*-test, kdy byly porovnány jednotlivé skupiny jedinců vůči sobě.

5. Výsledky

5.1 Popis modelového organismu

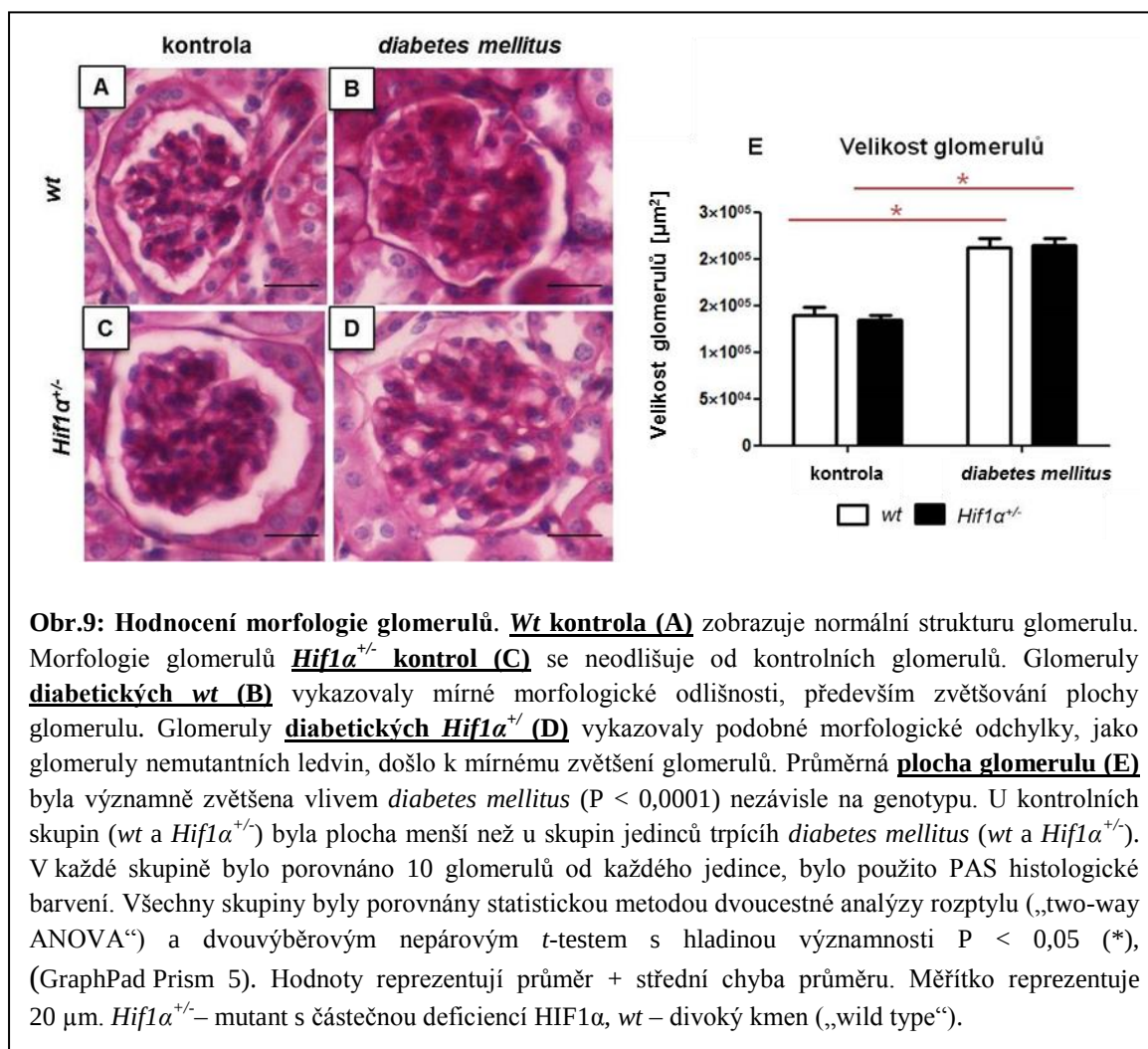
V této diplomové práci byla studována funkční role transkripčního faktoru HIF1 α na rozvoj DN. Pro sledování vlivu funkční role HIF1 α signální dráhy při rozvoji DN byl použit myší model s heterozygotní globální delecí *Hif1 α ^{+/-}*. Základní hodnocení fenotypu bylo provedeno u čtyř skupin jedinců (*wt* kontrola, *wt* s indukovaným *diabetes mellitus*, *Hif1 α ^{+/-}* kontrola, *Hif1 α ^{+/-}* s indukovaným *diabetes mellitus*); v každé skupině bylo hodnoceno 8 samců. *Diabetes mellitus* byl indukován pomocí streptozicinu (STZ) (viz. Metody 4.1, str. 38). Glykemie vyšší než 13,9 mmol/l krevní glukosy je diagnostikována jako *diabetes mellitus*. Hodnoty krevní glukosy byly změřeny na začátku experimentu a po 5 týdnech. Hodnoty krevní glukosy byly u skupiny *wt* kontrol na začátku pokusu $10,3 \pm 1,9$ mmol/l a po 5 týdnech $9,0 \pm 1,3$ mmol/l, u skupiny diabetických *wt* byla hladina glukosy *diabetes mellitus* $21,5 \pm 0,7$ mmol/l a po 5 týdnech od indukce *diabetes mellitus* $33,2 \pm 6,4$ mmol/l, u skupiny *Hif1 α ^{+/-}* kontrol byla hladina krevní glukosy $10,6 \pm 1,5$ mmol/l po 5 týdnech $9,1 \pm 1,3$ mmol/l, hladina krevní glukosy diabetických *Hif1 α ^{+/-}* jedinců byla $18,0 \pm 1,0$ mmol/l a po 5 týdnech od indukce $30,8 \pm 7,6$ mmol/l. Dále byl hodnocen vliv mutace a *diabetes mellitus* na přírůstek hmotnosti jedinců a na hmotnost ledvin. Byl určen a hodnocen průměrný přírůstek hmotnosti jedinců za 5 týdnů (obr.8A).



Vlivem působení *diabetes mellitus* se významně změnil přírůstek hmotnosti jedinců ($P < 0,0001$). Diabetičtí jedinci měli menší váhový přírůstek, než kontrolní jedinci, přičemž mutace na přírůstek hmotnosti neměla žádný významný vliv. Dále byla sledována hmotnost ledvin, neboť zvětšování hmotnosti ledvin je základním patologickým jevem, který je spojován s rozvojem diabetické nefropatie. Po 5 týdnech vlivu *diabetes mellitus* bylo pozorováno statisticky významné navýšení hmotnosti ledvin u diabetických jedinců ($P = 0,0127$). Hmotnost ledvin nebyla ovlivněna částečnou deficiencí HIF1 α (obr.8B, str. 52).

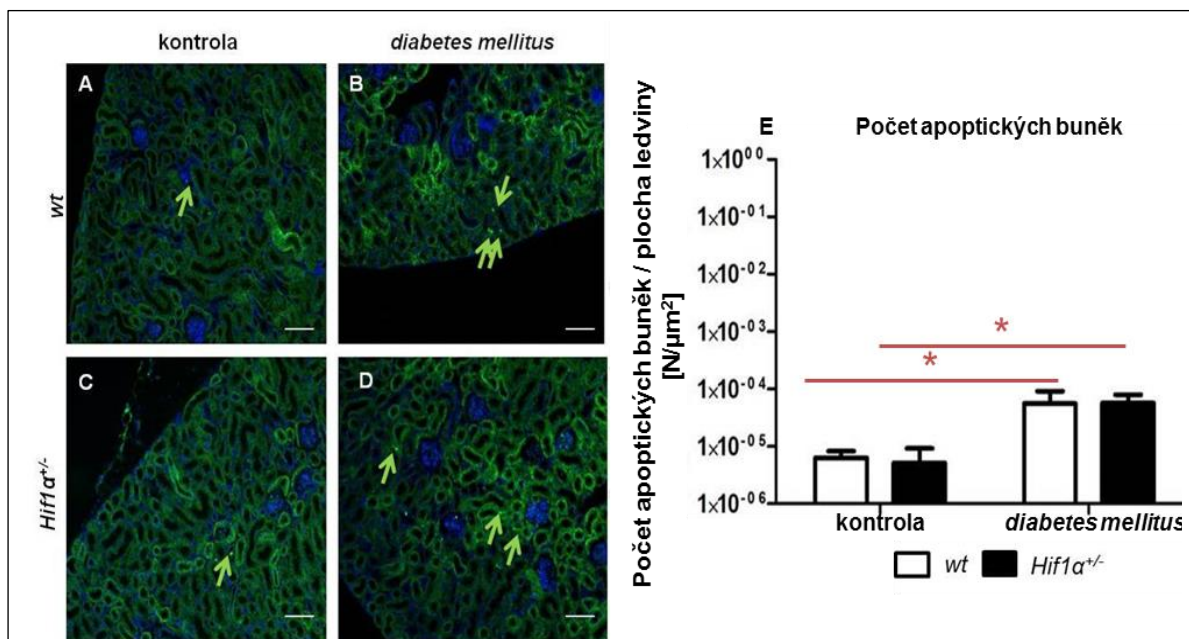
5.1.1 Histologická analýza ledvin

Pro určení všech histopatologických odchylek byla provedena histologická analýza ledvin. Bylo využito metod klasické histologie (PAS barvení) a speciálních molekulárních metod (metoda TUNEL pro detekci apoptózy). PAS barvení barví polysacharidy, glykoproteiny a glykolipidy, hlavní složky mezibuněčné hmoty, která se hromadí v glomerulu.



Při hodnocení základních anatomických struktur bylo použito 5 jedinců z každé skupiny a od každého jedince byly posuzovány 10 glomerulů (obr.9E, str. 53). U skupin diabetických jedinců (*wt* a *Hif1α*^{+/-}) byly zjištěny mírné změny v morfologii, zejména zvětšení velikosti glomerulů a zmenšení filtrační štěrby. Po 5 týdnech vlivu *diabetes mellitus* bylo detekováno významné zvětšení plochy glomerulů diabetických ledvin o 20% ($P < 0,0001$) (obr.9B a D, str. 51), které je klasifikováno jako poškození 1.třídy. Vliv částečné deficiencie HIF1α nebyl statisticky významný (obr.9E, str 53). Nefroskleróza a zvýšený obsah mezibuněčné hmoty v glomerulech, které odpovídají vyššímu stupni poškození, zjištěny nebyly.

Při rozvoji chronických komplikací *diabetes mellitus* dochází k navýšení počtu apoptických buněk. Pro stanovení celkového počtu apoptických buněk byla použita metoda TUNEL, která detekuje zlomy DNA, vznikající v důsledku apoptózy. Z každé skupiny (*wt* kontrola, diabetičtí *wt*, *Hif1α*^{+/-} kontrola, diabetičtí *Hif1α*^{+/-}) byli hodnoceni 3 jedinci. Počet apoptických buněk byl vztažen k celkové ploše ledviny v řezu (obr.10). Byl prokázán významný vliv *diabetes mellitus* na počet apoptických buněk ($P = 0,0376$) nezávisle na genotypu.



Obr.10: Detekce apoptózy metodou TUNEL *wt* kontrola (A), *wt diabetes mellitus* (B), *Hif1α*^{+/-} kontrola (C), *Hif1α*^{+/-} *diabetes mellitus* (D). Zelené šipky ukazují pozitivní apoptické buňky.

Byl prokázán vliv *diabetes mellitus* ($P = 0,0376$) na **počet apoptických buněk (E)** v ledvině. Bylo zjištěno významné zvýšení počtu apoptických buněk nezávisle na genotypu. Počet pozitivních buněk byl vztažen na celkovou plochu ledviny. Byli porovnání 3 jedinci z každé skupiny. Všechny skupiny byly porovnány dvoucestnou analýzou rozptylu („two-way ANOVA“) a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem s hladinou významnosti, která je vyznačena hvězdičkou $P < 0.05$ (*), (GraphPad Prism 5). Hodnoty reprezentují průměr + střední chyba průměru. Měřítka reprezentuje 200 μm. *Hif1α*^{+/-} – mutant s částečnou deficiencí HIF1α, *wt* – divoký kmen („wild type“).

Ve skupině diabetických *wt* došlo k významnému navýšení počtu apoptických buněk v ledvinné tkáni oproti *wt* kontrole ($P < 0.05$). A stejně tomu bylo i u mutantních jedinců, kdy byl detekován významný nárůst počtu pozitivních buněk u diabetických *Hif1α*^{+/-} oproti *Hif1α*^{+/-} kontrole ($P < 0.05$). Kombinovaný vliv genotypu a *diabetes mellitus* na počet apoptických buněk nebyl prokázán.

5.2 Relativní exprese vybraných genů

Relativní genová exprese byla měřena v kůře ledviny, protože se zde nacházejí nejdůležitější části nefronu – proximální a distální tubulus a glomerulus, jejichž poškození je spojováno s poškozením funkce ledvin. Relativní exprese byla určena pomocí metody qPCR. Pro analýzy bylo vybráno 8 genů, které se uplatňují při některém z patologických procesů ovlivňujících vznik a rozvoj DN (apoptóza, EMT, EndMT) a jsou prokázanými nebo možnými cílovými molekulami HIF1α signální dráhy. Analýzou exprese těchto genů, byla odhalována funkční role HIF1α signální dráhy při rozvoji DN. Byl porovnán vliv mutace, částečné delece *Hif1α*, vliv *diabetes mellitus* a zároveň byla určena vzájemná interakce těchto dvou vlivů na genovou expresi („two-way ANOVA“). V případě statistické významnosti jednotlivých vlivů a jejich interakce, byly skupiny porovnány pomocí dvouvýběrového nepárového *t*-testu.

Ctgf a *Tgfb1* (obr.11A-B, str. 57) se podílejí na patologické remodelaci tkáně převážně v oblasti tubulů a na rozvoji tubulointersticiální fibrózy. Relativní exprese genu *Ctgf* byla ovlivněna vzájemnou interakcí působení genotypu a diabetického prostředí ($P < 0,001$). Vlivem částečné delece *Hif1α* došlo ke snížení exprese *Ctgf* u *Hif1α*^{+/-} kontrol oproti *wt* kontrole ($P = 0,0001$). Exprese *Ctgf* byla snížena v kůře diabetických *wt* ledvin oproti *wt* kontrolám ($P = 0,0001$). Kombinovaný vliv těchto faktorů významně ovlivnil expresi *Ctgf*, u diabetických *Hif1α*^{+/-} byla exprese *Ctgf* zvýšená oproti diabetickým *wt* ($P = 0,004$). Exprese *Tgfb1* byla také ovlivněna vzájemnou interakcí působení genotypu a *diabetes mellitus* ($P < 0,001$), podobně jako u *Ctgf*. Vlivem působení genotypu došlo ke snížení exprese tohoto genu u *Hif1α*^{+/-} kontrol oproti *wt* kontrolám. Vlivem působení diabetického prostředí došlo ke snížení exprese *Tgfb1* u diabetických *wt* oproti *wt* kontrolám ($P = 0,0001$), naopak tomu bylo u mutantů, kdy došlo ke zvýšení exprese *Tgfb1* u diabetických *Hif1α*^{+/-} oproti *Hif1α*^{+/-} kontrolám ($P = 0,02$).

Vzájemná interakce vlivů genotypu a diabetického prostředí vedla ke zvýšení exprese *Tgfb1* u diabetických *Hif1α^{+/-}* oproti diabetickým *wt* ($P = 0,009$).

SOX9 je transkripční faktor, který v ledvině reguluje hromadění kolagenu IV a aktivaci epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Relativní exprese Sox9 (obr.11C, str. 57) byla ovlivněna vzájemnou interakcí vlivů genotypu a *diabetes mellitus* ($P = 0,0007$). Bylo detekováno snížení exprese Sox9 u diabetických *wt* oproti *wt* kontrole ($P = 0,0049$). Naopak tomu bylo u mutantních skupin, kdy došlo ke zvýšení exprese Sox9 u diabetických *Hif1α^{+/-}* oproti *Hif1α^{+/-}* kontrolám ($P = 0,07$) a u skupiny diabetických *Hif1α^{+/-}* oproti skupině *wt* diabetických jedinců ($P = 0,001$).

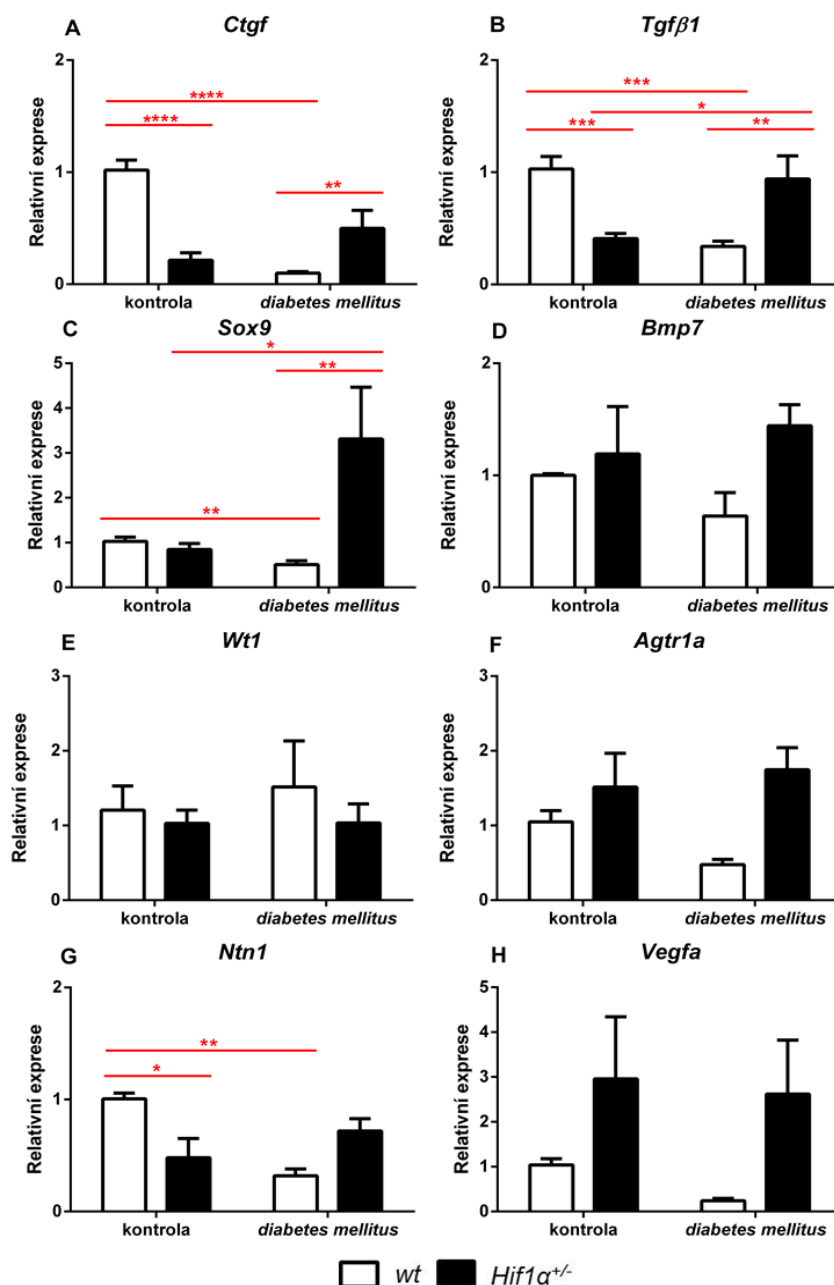
BMP7 patří do skupiny růstových faktorů, které se v ledvině podílejí na EMT. Nebyly odhaleny žádné významné expresní změny (obr.11D, str. 57) na úrovni mRNA.

Dále byla měřena exprese *Wt1* (obr.11E, str. 57), tento gen je velmi důležitý pro zachování funkce podocytů, tedy nejdůležitějších buněk vyskytujících se v glomerulu. Nebyly sledovány žádné expresní změny na úrovni mRNA.

AT1 je exprimovaný především v glomerulu, jedná se o receptor pro hormon AngII, který významně reguluje ledvinnou filtraci v glomerulech. Exprese *Agtr1a* byla mírně snížena u diabetických *wt* v porovnání s diabetickými *Hif1α^{+/-}* mutanty a u diabetických *wt* oproti *wt* kontrolám, tyto expresní změny nebyly statisticky významné (obr.11F, str. 57).

NTN1 je protein, který působí jako pozitivní regulátor apoptózy. Exprese genu *Ntn1* (obr.11G, str. 57) byla ovlivněna vzájemnou interakcí působení genotypu a *diabetes mellitus* ($P = 0,0015$), došlo ke snížení *Ntn1* exprese u diabetických *wt* oproti *wt* kontrole ($P = 0,0043$). Vlivem mutace došlo k významnému snížení exprese u *Hif1α^{+/-}* kontrol oproti *wt* kontrolám ($P = 0,035$).

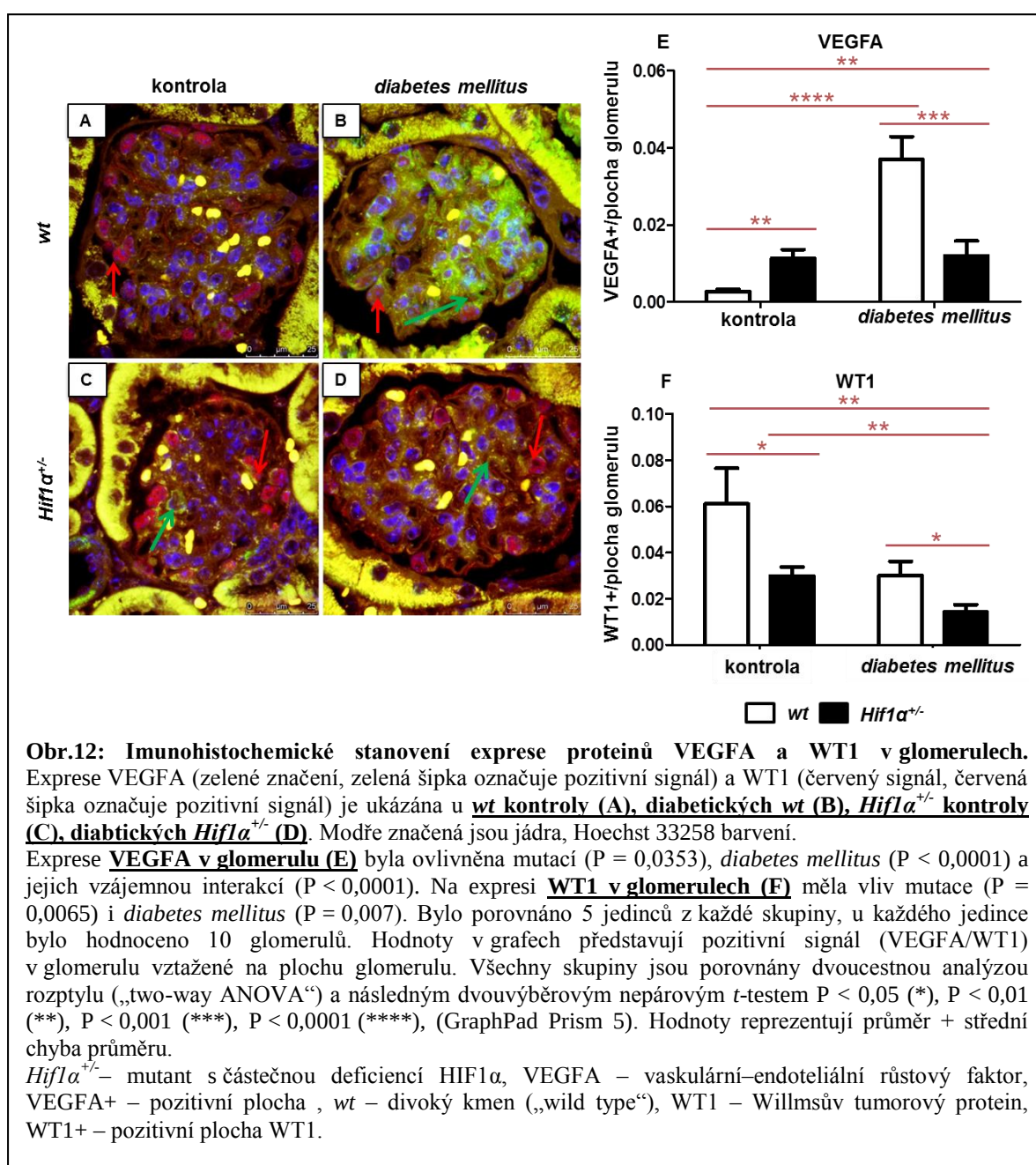
VEGFA je růstovým faktorem, jehož účinek je nejvýznamnější v glomerulech, kde se podílí na podpoře funkce podocytů. Při rozvoji DN má vliv na patologickou remodelaci tkáně. Pro měření byla použita sada primerů, které se vážou na sekvence v exonu 1 a exonu 2 a detekují všechny izoformy *Vegfa* mRNA. Výsledky ukazují deregulaci exprese *Vegfa* v kůře ledvin vlivem mutace. Částečná delece *Hif1a* způsobila vysokou variabilitu v expresi mRNA bez ohledu na diabetes, kdy někteří *Hif1α^{+/-}* mutanti měli až 10-ti násobně vyšší nebo nižší expresi v porovnání s *wt* (obr.11G, str. 57).



Obr.11: qPCR analýza genů *Ctgf*, *Tgfb1*, *Sox9*, *Bmp7*, *Wt1*, *Agtr1a*, *Ntn1*, *Vegfa* v kůře ledvin wt kontrol, diabetických wt, *Hif1a*^{+/-} kontrol, diabetických *Hif1a*^{+/-}. Všechny skupiny byly porovnány dvoucestnou analýzou rozptylu („two-way ANOVA“) a následným dvouvýběrovým nepárovým t- testem $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), (GraphPad Prism 5). Hodnoty reprezentují průměr + střední chyba průměru. **Relativní exprese *Ctgf* (A)** N_{wt} kontrola = 5, N_{wt} DM = 6, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 6, „two-way ANOVA“: interakce ($P < 0,001$), vliv *diabetes mellitus* ($P = 0,0005$). **Relativní exprese *Tgfb1* (B)** N_{wt} kontrola = 6, N_{wt} DM = 5, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 5, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 5, „two-way ANOVA“: interakce ($P < 0,001$). **Relativní exprese *Sox9* (C)** N_{wt} kontrola = 6, N_{wt} DM = 8, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 5, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 6, „two-way ANOVA“: vliv genotypu ($P = 0,0067$), interakce ($P = 0,0007$). **Relativní exprese *Bmp7* (D)** N_{wt} kontrola = 5, N_{wt} DM = 6, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 5. **Relativní exprese *Wt1* (E)** N_{wt} kontrola = 8, N_{wt} DM = 7, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 8. **Relativní exprese *Agtr1a* (F)** N_{wt} kontrola = 5, N_{wt} DM = 8, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 7. **Relativní exprese *Ntn1* (G)** N_{wt} kontrola = 6, N_{wt} DM = 5, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 5, „two-way ANOVA“: interakce ($P = 0,0015$). **Relativní exprese *Vegfa* (H)** N_{wt} kontrola = 6, N_{wt} DM = 6, $N_{Hif1a+/-}$ kontrola = 7, $N_{Hif1a+/-}$ DM = 7. *Agtr1a* – receptor pro angiotenzin II, typ 1, podjednotka a, *Bmp7* – „bone morphogenic protein“, *Ctgf* – pojivový růstový faktor, *HIF1a* – hypoxií indukovaný faktor 1a, *Hif1a*^{+/-} – mutant s částečnou deficiencí HIF1a, *Ntn1* – netrin 1, *Sox9* – SRY-HMG Box 9, *Tgfb1* – transformující růstový faktor, *Vegfa* – vaskulární endoteliální růstový faktor A, wt – divoký kmen („wild type“), *Wt1* – Willmsův tumorový protein 1.

5.3 Imunohistochemické stanovení exprese proteinů VEGFA a WT1

Imunohistochemickou detekcí byla analyzována exprese dvou proteinů VEGFA a WT1 v glomerulech. VEGFA je vaskulární-endoteliální růstový faktor, důležitý pro obnovu a ochranu cév, ale podílí se i na patologické EMT a EndMT remodelaci tkáně. WT1 je marker pro podocyty, který je konstitutivně exprimován a je důležitý pro fungování těchto buněk. Oba tyto proteiny jsou zároveň cílovými molekulami HIF1 α signalizace. Bylo hodnoceno 5 jedinců z každé skupiny wt kontrol, diabetických wt, *Hif1 α ^{+/-}* kontrol a diabetických *Hif1 α ^{+/-}* (obr.12A-D), u každého jedince bylo porovnáno 10 glomerulů. Byl zjištěn vliv částečné delece HIF1 α ($P = 0,0353$) na expresi VEGFA v ledvinných glomerulech.

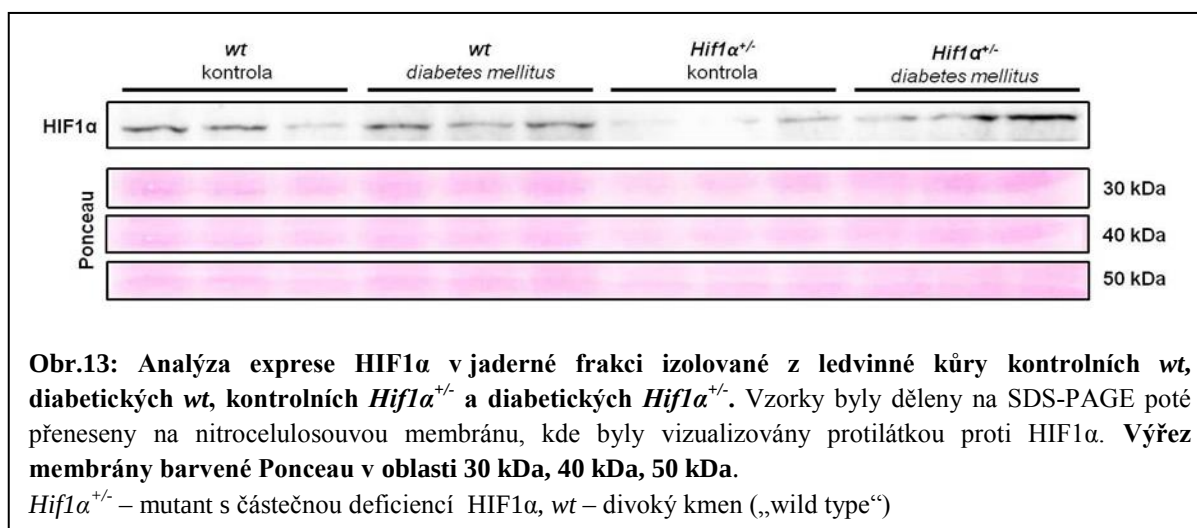


Dále byl zjištěn významný vliv *diabetes mellitus* ($P < 0,0001$) na expresi tohoto proteinu a vzájemná interakce *diabetes mellitus* a mutace na expresi VEGFA ($P < 0,0001$). Expres VEGFA (obr.12 E, str. 58) byla zvýšena u *Hif1α*^{+/-} kontroly oproti wt kontrole ($P = 0,0050$). Dále byl detekován vliv diabetického prostředí, kdy u diabetických wt glomerulů byla významně zvýšená VEGFA exprese oproti wt kontrole ($P < 0,0001$). Naopak tomu bylo v případě mutantního *Hif1α*^{+/-}, kdy vlivem *diabetes mellitus* došlo ke snížení exprese VEGFA v glomerulu v porovnání s diabetickými wt ($P = 0,003$) i kontrolními wt ($P = 0,0462$). Tyto výsledky naznačují, že regulace exprese VEGFA je ovlivněna kombinací HIF1α deficeince a diabetického prostředí.

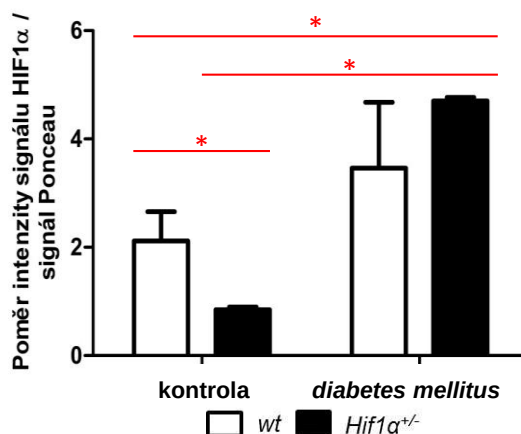
Podobně jako VEGFA i exprese WT1 (obr.12F, str. 58) v glomerulech byla ovlivněna genotypem ($P = 0,0065$) a *diabetes mellitus* ($P = 0,070$). Vlivem mutace došlo k významnému snížení exprese WT1 u *Hif1α*^{+/-} kontroly oproti wt kontrole ($P = 0,0423$). Glomerulární exprese WT1 byla nižší u diabetických *Hif1α*^{+/-} než u kontrolních *Hif1α*^{+/-} ($P = 0,0041$). Kombinace mutace a diabetu významně snížila expresi WT1 u diabetických *Hif1α*^{+/-} v porovnání s diabetickými wt ($P = 0,0192$). Snížení exprese WT1 souvisí s úbytkem podocytů, zhoršením filtrační funkce ledvin a tedy s rozvojem DN.

5.4 Analýza exprese HIF1α v ledvinné kůře

Expres HIF1α byla měřena v jaderné frakci, která byla izolována z ledvinné kůry. Právě v tomto buněčném kompartmentu HIF1α plní svou funkci transkripčního faktoru. K určení hladiny HIF1α byla použita imunodetekce do SDS-PAGE. Expres HIF1α byla měřena u 3 jedinců z každé skupiny. K celkovému signálu tří proteinů o velikosti 30 kDa, 40 kDa a 50 kDa (detekované pomocí Ponceau) byla vztažena intenzita signálu HIF1α (obr.13) (Romero-Calvo, Ocon et al. 2010).



Vlivem mutace došlo ke snížení množství HIF1 α u kontroly *Hif1 α ^{+/-}* oproti *wt* kontrole (obr.14). Hladina HIF1 α v ledvinné kůře bylo významně ovlivněno působením *diabetes mellitus* (P = 0,043). Expres HIF1 α byla významně zvýšená u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti *Hif1 α ^{+/-}* kontrole (P = 0,039) i *wt* kontrole (P = 0,042). U skupiny diabetických *wt* došlo také k navýšení exprese HIF1 α oproti *wt* kontrole, tato změna však nebyla statisticky významná. Tyto výsledky naznačují, že by HIF1 α transkripční faktor mohl mít podíl na vzniku a rozvoji DN.



Obr.14: Denzitometrické vyhodnocení hladiny HIF1 α v ledvinné kůře. Graf zobrazuje poměr intenzit signálu HIF1 α vztažený k součtu intenzit signálů proteinů o velikosti 30 kDa, 40 kDa a 50 kDa, které byly detekovány Ponceau barvením. Všechny skupiny byly porovnány dvoucestnou analýzou rozptylu („two-way ANOVA“) a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem P < 0,05 (*), (GraphPad Prism 5).

Hodnoty reprezentují průměr + střední chyba průměru.

Hif1 α ^{+/-} – mutant s částečnou deficiencí HIF1 α , *wt* – divoký kmen („wild type“)

6. Diskuze

Onemocnění ledvin spojené s *diabetes mellitus* je závažným celosvětovým problémem, jedná se o nejčastější příčinu konečného selhání ledvin. Zpravidla je DN doprovázena i jinou chronickou komplikací, jako je diabetická kardyomyopatie a retinopatie (Škrha, Lebl et al. 2009). Vlivem dlouhodobé hyperglykemie v tkáních dochází ke stimulaci alternativních procesů, zejména dochází k modifikaci proteinů glykací a tvorbě pokročilých produktů glykace, dále se aktivuje polyolová dráha a proteinkinasa C. Tyto změny vedou ke vzniku oxidačního stresu uvnitř tkání (Peyroux a Sternberg 2006). V buňkách vzniká hypoxie a pseudohypoxie (Nangaku a Fujita 2008, Sun, Su et al. 2013). Odpověď na hypoxické stresové prostředí je řízena transkripčním faktorem HIF1 α (Semenza 2000). Funkční role HIF1 α v rozvoji DN nebyla dosud objasněna.

V této diplomové práci byla studována funkční role transkripčního faktoru HIF1 α na rozvoj DN pomocí myšího modelu s heterozygotní mutací *Hif1 α ^{-/-}*. Úplná delece tohoto genu je u myši letální v embryonálním dni 10,5 v důsledku kardiovaskulárních defektů (Iyer, Leung et al. 1998, Kotch, Iyer et al. 1999, Compennolle, Brusselmans et al. 2003). Z tohoto důvodu nebylo možné homozygotního *Hif1 α ^{+/-}* mutantu použít pro naše analýzy. Heterozygotní *Hif1 α ^{+/-}* mutanti se vyvíjejí normálně, ale pokud jsou vystaveni působení stresových podmínek (hypoxie, *diabetes mellitus*) jejich odpovědi jsou ovlivněné mutací (Yu, Shimoda et al. 1999, Li, Bosch-Marce et al. 2006, Bohuslavova, Kolar et al. 2014). Toto také potvrzuje naše výsledky. Při posuzování fenotypových změn se mutantní *Hif1 α ^{+/-}* jedinci nelišili od nemutantních wt jedinců, vykazovali podobný přírůstek hmotnosti během 5 týdnů a podobnou hmotnost ledvin. Z histologického hlediska se morfologie mutantních jedinců také nelišila od wt kontroly a nezvýšil se ani počet apoptických buněk. Výsledky tedy ukazují, že mutace neovlivnila ledvinnou tkáň za normálních podmínek.

Histologické analýzy neprokázaly žádné významné rozdíly mezi diabetickými *Hif1 α ^{+/-}* a diabetickými wt. U obou skupin bylo zjištěno zvětšení jak plochy glomerulů, tak zvětšení celých ledvin. Všechny tyto změny jsou klasifikovány jako poškození 1. třídy, tedy rané stádium DN (Fioretto and Mauer 2007). Stupeň poškození ledvinné tkáně, který jsme identifikovali, odpovídá i krátkodobému zatížení experimentálních zvířat diabetem (5 týdnů). Rozvoj DN je ovlivněn celou řadou faktorů: věkem, krevním tlakem, rozvojem jiné chronické komplikace diabetu a genetickou predispozicí, proto je vznik a rozvoj DN

zcela individuální. V literatuře je popsáno, že po uplynutí minimálně 12 týdnů v *diabetes mellitus*, dochází u myši k plnému rozvoji DN s poškozením vyšších tříd DN (Qi, Fujita et al. 2005), kdy dochází ke vzniku lézí a dalších vážných morfologických změn (Fioretto a Mauer 2007). Na rozvoji DN se podílí dva základní procesy apoptóza a EMT/EndMT (Kumar, Robertson et al. 2004, Kanasaki, Taduri et al. 2013). Pro sledování role HIF1 α signální dráhy na rozvoj DN byly vybrány cílové molekuly HIF1 α dráhy, které se uplatňují v těchto patologických procesech.

Apoptózou zanikají především epiteliální buňky, které tvoří proximální a distální tubuly, dále pak podocyty (Kumar, Robertson et al. 2004). Při zvýšené apoptóze dochází ke snížení počtu buněk, které zajišťují hlavní funkce ledviny a dochází ke zhoršení funkce ledvin. V této diplomové práci bylo ukázáno, že počet apoptických buněk byl navýšen u diabetických jedinců, ale toto navýšení bylo nezávislé na genotypu. Významným negativním regulátorem apoptózy je NTN1, při snížení jeho exprese dochází ke zvýšení počtu apoptických buněk (Coissieux, Tomsic et al. 2011). Naše výsledky ukazují, že vlivem *diabetes mellitus* došlo ke snížení exprese *Ntn1* v kůře ledvin u diabetických wt oproti wt kontrolám. Toto snížení exprese *Ntn1* je v souladu se zvýšenou apoptózou v diabetických ledvinách. Exprese *Ntn1* byla snížena u nediabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti wt kontrolám. Toto snížení u nediabetických *Hif1 α ^{+/-}* mutantů potvrzuje přímou regulaci *Ntn1* genu HIF1 α signální dráhou, kdy částečnou delecí došlo ke snížení mRNA hladiny tohoto genu u kontrolních *Hif1 α ^{+/-}* oproti wt kontrolám. Snížená exprese *Ntn1* mRNA u kontrolních *Hif1 α ^{+/-}* však pravděpodobně nebyla dostatečná pro aktivaci apoptózy, což bylo potvrzeno stanovením počtu apoptických buněk v ledvině u *Hif1 α ^{+/-}*. Počet apoptických buněk byl v našem modelu rané fáze DN ovlivněn pouze *diabetes mellitus* nikoliv genotypem. Vzhledem k tomu, že exprese tohoto genu byla stanovena pouze v kůře ledvin, tyto výsledky nekorelují s počtem apoptických buněk v celé ledvině.

Dalším patologickým procesem vzniku a rozvoje DN je remodelace ledvinové tkáně. Tyto procesy jsou regulovány celou řadou molekul, jednou z těchto molekul je i CTGF (Qi, Chen et al. 2008). Při hodnocení hladiny mRNA *Ctgf* byl prokázán kombinovaný vliv mutace a *diabetes mellitus*. Vlivem diabetického prostředí došlo ke snížení exprese tohoto profibrotického cytokinu u diabetických wt v porovnání s nediabetickými wt. Vlivem mutace a *diabetes mellitus* se zvýšila exprese *Ctgf* u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti diabetickým wt a *Hif1 α ^{+/-}* kontrolám. Zvýšení exprese *Ctgf* je popisováno při rozvoji

patologických onemocnění ledvin, především při rozvoji fibrózy v ledvinné tkáni (Denichilo et al. 2000). Toto zvýšení exprese, které je spojované s patologickou remodelací tkáně a rozvojem DN, ukazuje, že HIF1 α signální dráha se účastní regulace exprese tohoto profibrotického cytokinu a zároveň, že omezení HIF1 α signalizace může urychlit rozvoj DN. V ledvinných buňkách nemutantních jedinců dochází ke kompenzaci negativního vlivu hyperglykemického prostředí dosud neznámým mechanismem a nedochází v nich k aktivaci profibrotických molekul a tím i k aktivaci EMT/EndMT.

Další molekulou, která se podílí na regulaci EMT a EndMT, je TGF β 1 (Kalluri a Weinberg 2009). Hladina mRNA vykazovala stejný trend jako tomu bylo v případě *Ctgf*. Vlivem diabetického prostředí došlo ke snížení exprese *Tgfb1* u diabetických wt oproti wt kontrolám, které ukazuje, že v ledvinných buňkách dochází ke kompenzaci negativního vlivu diabetického prostředí v tomto raném stádiu DN a předcházení rozvoji DN. Vlivem částečné delece HIF1 α došlo ke snížení *Tgfb1* exprese u *Hif1 α ^{+/-}* kontrol oproti wt kontrolám, což potvrzuje, že exprese *Tgfb1* je regulována HIF1 α signální dráhou. U heterozygotních mutantů, vlivem částečné deficiencie HIF1 α a stresových podmínek (*diabetes mellitus*), došlo k navýšení exprese u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti *Hif1 α ^{+/-}*-kontrolám a oproti diabetickým wt. Zvýšení exprese *Tgfb1* je spojováno se vznikem fibrotických onemocnění ledvin (Hill, Flyvbjerg et al. 2000). Expresní změny genu *Tgfb1* ukazují, že HIF1 α hraje funkční roli při regulaci vzniku fibrózy vlivem diabetického prostředí.

Další cílovou molekulou HIF1 α signální dráhy, která se podílí na EMT/EndMT je transkripční faktor SOX9 (Kolset, Reinholt et al. 2012). Zvýšení exprese tohoto transkripčního faktoru vede k syntéze kolagenu IV a jeho hromadění v mesangiu (Kishi, Abe et al. 2011). Expresní změny Sox9 ukazují vliv mutace a *diabetes mellitus* na regulaci exprese tohoto transkripčního faktoru. Kombinovaným vlivem částečné deficiencie HIF1 α a *diabetes mellitus* dochází ke zvýšení exprese Sox9 u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti diabetickým wt. Naše výsledky naznačují, že částečná deficiencie HIF1 α podporuje rozvoj DN, zejména remodelaci tkáně se zvýšenou syntézou kolagenu IV.

Jedním z důležitých cytokinů je VEGFA, který mění permeabilitu stěn kapilár, dále ovlivňuje angiogenezi, migraci a buněčný růst (O'Hern and Fishbein 1968). VEGFA patří mezi základní sledované parametry při hodnocení onemocnění ledvin.

Raná fáze DN je spojena se zvýšením exprese VEGFA (de Vriese, Tilton et al. 2001). Hladina VEGFA je přísně regulována a každá odchylka má vliv na fyziologii ledvinných buněk (de Vriese, Tilton et al. 2001, Sivaskandarajah, Jeansson et al. 2012). VEGFA je jednou z významných cílových molekul HIF1 α signální dráhy (Ferrara, Gerber et al. 2003). Také náš výzkum se zaměřil na hodnocení exprese *Vegfa*. Naše qPCR analýzy exprese *Vegfa* na úrovni mRNA ukázaly značnou variabilitu u *Hif1 α ^{+/-}*, kdy u skupiny kontrolních *Hif1 α ^{+/-}* u tří jedinců došlo ke zvýšení exprese, u tří jedinců ke snížení exprese a u jednoho jedince nebyla exprese *Vegfa* změněna. U skupiny diabetických *Hif1 α ^{+/-}* došlo u pěti jedinců ke zvýšení exprese, naopak u tří jedinců došlo ke snížení exprese *Vegfa* genu. Tato variabilita u skupiny nediabetických i diabetických *Hif1 α ^{+/-}* ukazuje kompletní deregulaci exprese *Vegfa* vlivem částečné delece *Hif1 α* . V této diplomové práci byla hodnocena i hladina proteinu VEGFA v glomerulech. Regulace hladiny proteinu VEGFA byla jiná, než regulace hladiny mRNA v ledvinné kůře. U nediabetických *Hif1 α ^{+/-}* je částečná deficience HIF1 α zřejmě kompenzována zvýšenou expresí VEGFA, aby byla zajištěna funkce glomerulárních buněk, zejména podocytů. Vlivem *diabetes mellitus* došlo ke zvýšení exprese VEGFA v glomerulech *wt*, ale u *Hif1 α ^{+/-}* mutantů hladina VEGFA zůstala stejná jako u nediabetických *Hif1 α ^{+/-}*. Tyto výsledky naznačují, že regulace exprese VEGFA u mutantních jedinců *Hif1 α ^{+/-}* je negativně ovlivněna částečnou delecí *Hif1 α* a zároveň potvrzují funkční roli HIF1 α při regulaci VEGFA. Zvýšená exprese VEGFA u diabetických *wt* v rané fázi DN je v souladu s publikovanými výsledky, kdy je toto zvýšení spojováno s ochranou ledvinných buněk proti jejich poškození (Schrijvers, Flyvbjerg et al. 2004).

Další cílová molekula HIF1 α signální dráhy, která byla v této práci hodnocena na úrovni mRNA i proteinu, je WT1. Na úrovni mRNA byly detekovány jen mírné změny. Vlivem mutace došlo ke snížení exprese *Wt1* u *Hif1 α ^{+/-}* kontrol oproti *wt* kontrolám, vlivem *diabetes mellitus* došlo ke snížení exprese i u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* oproti v diabetickým *wt*. Exprese *Wt1* byla měřena v celé kůře, proto pravděpodobně nebyly odhaleny významné změny na úrovni mRNA. Při hodnocení hladiny proteinu již Guo et al. (2002) prokázali, že WT1 je nezbytný pro funkci podocytů, a že při snížení hladiny WT1 dochází k rozvoji patologických změn glomerulů. Podocyty jsou nejvíce ovlivněny diabetickým prostředím, kdy dochází ke snížení jejich počtu (Rask-Madsen and King 2010). Naše výsledky se shodují s tímto zjištěním, kdy u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* a *wt* došlo ke snížení exprese WT1

oproti nediabetickým skupinám. Významný rozdíl byl detekován i mezi nediabetickými skupinami *wt* a *Hif1α^{+/-}*, kdy u *Hif1α^{+/-}* kontrol byla exprese WT1 snížena oproti *wt* kontrolám. Opět se tedy projevil významný vliv částečné deficiencie HIF1α na ledvinné buňky, kdy vlivem mutace byla snížena hladina WT1 v glomerulech za fyziologických podmínek. Kombinovaný vliv mutace a *diabetes mellitus* ovlivnil molekulární odpovědi v raném stadiu DN. Tyto výsledky potvrzují významnou roli HIF1α při rozvoji patologických změn spojených s DN, ovlivněním funkčních buněk ledvinného filtračního systému – podocytů.

Hormon AngII reguluje řadu ledvinných funkcí, je součástí RAS dráhy, která se účastní regulace PKC, VEGFA, TGFβ1 (Wolf and Ritz 2005). V současné době se při léčbě DN podávají blokátory, které inhibují vznik tohoto hormonu z jeho prekurzoru (Imanishi, Yoshioka et al. 1997). V této diplomové práci jsme analyzovali expresi receptoru pro tento hormon (*Agtr1a*, AT1). Tento receptor je exprimován na povrchu podocytů a tubulárních buněk (Ruiz-Ortega, Ruperez et al. 2006). Při studiu diabetických ledvin, nejsou zdroje jednotné, řada studií popisuje zvýšenou expresi AT1 v diabetickém prostředí (Wolf, Butzmann et al. 2002, Hoffmann, Podlich et al. 2004), naopak jiné studie popisují sníženou expresi AT1 (Cheng, Burns et al. 1994, Rask-Madsen a King 2010). Naše výsledky ukázaly pouze malé rozdíly v expresi *Agtr1a* v ledvinách mezi diabetickými *wt* oproti *wt* kontrolám a dále u diabetických *Hif1α^{+/-}* oproti diabetickým *wt*. Tyto změny *Agtr1a* exprese jsou dalším projevem vlivu částečné deficiencie HIF1α na regulaci molekul významných pro ledvinné funkce a rozvoj DN.

Tato diplomová práce se zabývala hodnocením funkční role HIF1α signální dráhy při rozvoji DN s využitím heterozygotního mutantu s delecí *Hif1α* genu. Z histopatologického hlediska nedošlo k výrazným morfologickým změnám v ledvinné tkáni mezi diabetickými *wt* a diabetickými *Hif1α^{+/-}* jedinci a zároveň tyto výsledky potvrzují ranou fázi DN. Výrazné změny byly však zjištěny na molekulární úrovni, kdy se exprese molekul podílejících se na rozvoji DN významně lišila mezi diabetickými *wt* a diabetickými *Hif1α^{+/-}* jedinci. Vlivem částečné delecí *Hif1α* a působením diabetického prostředí došlo ke stimulaci profibrotických a zánětlivých procesů, kterých se účastní molekuly kódované *Tgfb1*, *Ctgf*, *Sox9* geny. Naše výsledky naznačují, že HIF1α má protektivní funkci při rozvoji rané fáze DN, protože molekulární odpovědi na diabetické prostředí u heterozygotních *Hif1α^{+/-}* mutantů vedly k rychlejší progresi tohoto onemocnění.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo definovat funkční roli HIF1 signální dráhy při rozvoji DN. K tomuto účelu byl použit heterozygotní globální mutant *Hif1α*^{+/-}.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno následující

- *Diabetes mellitus* ovlivňuje morfologii ledvinné tkáně. Histologická analýza odhalila histopatologické změny, které odpovídaly ranému stádiu DN. Kdy došlo ke zvětšení glomerulů po 5 týdnech působení *diabetes mellitus* nezávisle na genotypu u obou diabetických skupin (wt i *Hif1α*^{+/-}).
- Částečná deficece HIF1α neměla vliv na morfologii ledviny. Histologický obraz se nelišil mezi kontrolními skupinami (wt i *Hif1α*^{+/-}).
- Vlivem *diabetes mellitus* došlo ke zvýšení počtu apoptických buněk v ledvině nezávisle na genotypu u obou diabetických skupin (wt i *Hif1α*^{+/-}).
- Exprese *Ntn1*, negativního regulátoru apoptózy, byla snížena diabetickým prostředím.
- Vzájemná interakce diabetu a částečné deficece HIF1α způsobila změnu v expresi *Ctgf*, *Tgfb1*, *Sox9*, které se významně podílí regulaci EMT/EndMT a fibrózi, a způsobila deregulaci *Vegfa*.
- Hladina proteinů (VEGFA, WT1) byla významně ovlivněna působením *diabetes mellitus* a mutace.
- Vlivem *diabetes mellitus* došlo k navýšení hladiny HIF1α v ledvinné kůře

Získané výsledky naznačují, že HIF1α má protektivní funkci při rozvoji rané fáze DN.

Seznam použité literatury

- Alberti, K. G. a Zimmet, P. Z.: Diabetic Med. 15(7): 539-553 (1998).
- Arora, M. K. a Singh, U. K.: Vasc. Pharmacol. 58(4): 259-271 (2013).
- Bartoš, V., Pelikánová, T.: Praktická diabetologie, Maxdorf, Praha (2011).
- Bohuslavova, R., Kolar, F., Sedmera, D., Skvorova, L., Papousek, F., Neckar, J. a Pavlinkova, G.: BMC Endocr. Disord. 14(1): 11 (2014).
- Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1): 248-254 (1976).
- Brosius, F. C., 3rd a Alpers, C. E.: Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 22(1): 17-25 (2013).
- Brownlee, M.: Diabetes 54(6): 1615-1625 (2005).
- Carney, E. F.: Nat. Rev. Nephrol. 8(12): 681 (2012).
- Catrina, S. B., Okamoto, K., Pereira, T., Brismar, K. a Poellinger, L.: Diabetes 53(12): 3226-3232 (2004).
- Clanton, T. L.: J. Appl. Physiol. 102(6): 2379-2388 (2007).
- Coissieux, M. M., Tomsic J., Castets M., Hampel H., Tuupanen S., Andrieu N., Comeras I., Drouet, Y., Lasset, C., Liyanarachchi, S., Mazelin, L., Puisieux, A., Saurin, J. C., Scoazec, Q., Wang, J. Y., Aaltonen, L., Tanner, S. M., de la Chapelle, A., Bernet, A. a Mehlen, P.: Gastroenterology 141(6): 2039-2046 (2011).
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Franco, D., Moorman, A., Dewerchin, M., Collen, D. a Carmeliet, P.: Cardiovasc. Res. 60(3): 569-579 (2003).
- Čihák, R., Grim, M., Med, M. a Helekal, I.: Anatomie, Grada, Praha (2002).
- Diabetická asociace ČR: "Data o diabetu v ČR.", dostupné z
URL: <http://www.diabetickaasociace.cz/co-je-diabetes/data-o-diabetu-v-cr/>, dne 20.3.2014
- Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, J. K., Lin, F., Farzadfar, Y. H., Khang, G., Stevens, A., Rao M., Ali, M. K., Riley, L. M. Robinson, C. A. a Ezzati, M.: Lancet 378(9785): 31-40(2011).
- de Vriese, A. S., Tilton, R. G., Elger, M., Stephan, C. C., Kriz, W. a Lameire, N. H.: J.: Am. Soc. Nephrol. 12(5): 993-1000 (2001).
- Dehne, N. a Brune, B.: Exp. Cell Res. 315(11): 1791-1797 (2009).

Dronavalli, S., Duka, I. a Bakris, G. L.: Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 4(8): 444-452 (2008).

Drummond, K. a Mauer, M.: Diabetes 51(5): 1580-1587 (2002).

Elmore, S.: Toxicol. Pathol. 35(4): 495-516 (2007).

Ferrara, N., Gerber, H.-P., a LeCouter, J.: Nat. Med. 9(6): 669-676 (2003).

Fioretto, P. a Mauer, M.: Semin. Nephrol. 27(2): 195-207 (2007).

Geraldes, P. a King, G. L.: Circ. Res. 106(8): 1319-1331 (2010).

Gilda, J. E. a Gomes, A. V.: Anal.Biochem. 440(2): 186-188 (2013).

Gnudi, L.: Nephrol., Dial., Transplant. 27(7): 2642-2649 (2012).

Gorlach, A. a Bonello, S.: Biochem. J. 412(3) (2008).

Habib, S. L.: World J. Diabetes 4(2): 27-30 (2013).

Hagg, M. a Wennstrom, S.: Exp. Cell. Res. 306(1): 180-191 (2005).

Han, W. Q., Zhu, Q., Hu, J., Li, P. L., Zhang, F. a Li, N.: Biochim. Biophys. Acta 1833(6): 1454-1462 (2013).

Heilig, C. W., Deb, D. K., Abdul, A., Riaz, H., James, L. R., Salameh, J. a Nahman, N., S., Jr.: Am. J. Nephrol. 38(1): 39-49 (2013).

Hill, C., Flyvbjerg, A., Gronbaek, H., Petrik, J., Hill, D. J., Thomas, C. R., Sheppard, M. C. a Logan, A.: Endocrinology 141(3): 1196-1208 (2000).

Hoffmann, S., Podlich D., Hähnel, B., Kriz, W. a Gretz, N.: J. Am. Soc. Neph. 15(6): 1475-1487 (2004).

Hohenstein, B., Hausknecht, B., Boehmer, K., Riess, R., Brekken, R. A. a Hugo, C. P.: Kidney Int. 69(9): 1654-1661 (2006).

Cheng, H.F., Burns, K. D. a Harris, R. C.: Kidney Int. 46(6): 1603-1610 (1994).

Chung, S. S. M., Ho, E. C. M., Lam, K. S. L. a Chung, S. K.: J. Am. Soc. Neph. 14(suppl 3): S233-S236 (2003).

Ikeda, T., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Ogata, N., Mori, Y., Nakamura, K., Ikegawa, S. a Chung, U. I.: J Bone Miner Metab 23(5): 337-340 (2005).

- Imanishi, M., Yoshioka, K., Okumura, M., Konishi, Y., Tanaka, S., Fujii, S. a Kimura, G.: *Kidney Int. Suppl.* 63: S198-200 (1997).
- Iyer, N. V., Leung, S. W. a Semenza, G. L.: *Genomics* 52(2): 159-165 (1998).
- Jang, G. Y., Jeon, J. H., Cho, S. Y., Shin, D. M., Kim, C. W., Jeong, E. M., Bae, H. C., Kim, T. W., Lee, S. H., Choi, Y., Lee, D. S., Park, S. C. a Kim, I. G.: *Oncogene* 29(3): 356-367 (2010).
- Jelínek, J. a Zicháček, V.: *Biologie pro gymnázia*, Nakladatelství Olomouc, . Olomouc (1998)
- Kalluri, R. a Neilson, E. G: *J. Clin. Invest.* 112(12): 1776-1784 (2003).
- Kalluri, R. a Weinberg, R. A.: *J. Clin. Invest.* 119(6): 1420 (2009).
- Kaluz, S., Kaluzova, M. a Stanbridge, E. J.: *Clin. Chim. Acta* 395(1-2): 6-13 (2008).
- Kanasaki, K., Taduri, G. a Koya, D.: *Front. Endocrinol.* 4. (2013).
- Kelly, K. J., Burford, J. L. a Dominguez, J. H.: *Am. J. Physiol.* 297(4): F923-931 (2009).
- Kishi, S., Abe, H., Akiyama, H., Tominaga, T., Murakami, T., Mima, A., Nagai, K., Kishi, F., Matsuura, M., Matsubara, T., Iehara, N., Ueda, O., Fukushima, N., Jishage, K. a Doi, K.: (2011): *Biol. Chem.* 286(37): 32162-32169 (2011).
- Kitamura, M. a Suto, T. S.: *Nephrol., Dial., Transplant.* 12(4): 669-679 (1997).
- Kolset, S. O., Reinholt, F. P. a Jenssen, T.: *J. Histochem. Cytochem.* 60(12): 976-986 (2012).
- Koopman, P.: *Cell Mol. Life Sci.* 55(6-7): 839-856 (1999).
- Kotch, L. E., Iyer, N. V., Laughner, E. a Semenza, G. L.: *Dev. Biol.* 209(2): 254-267 (1999).
- Koya, D. a King, G. L.: *Diabetes* 47(6): 859-866 (1998).
- Kumar, D., Robertson, S. a Burns, K. (2004): *Mol. Cell. Biochem.* 259(1-2): 67-70 (2004).
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K. a Kadowaki, T.: *Diabetes Res. Clin. Pract.* 55(1): 65-85 (2002).

- Lee, H. S.: J. Diabetes Metab. S9:008 (2013).
- Li, J., Bosch-Marce, M., Nanayakkara, A., Savransky, V., Fried, S. K., Semenza, G. L. a Polotsky, V. Y.: Physiol. Genomics 25(3): 450-457 (2006).
- Lindner, T. H., Monks, D., Wanner, C. a Berger, M.: Kidney Int. Suppl.(84): S186-191 (2003).
- Liu, Y.: J. Am. Soc. Nephrol. 15(1): 1-12 (2004).
- Liu, Y.: J. Am. Soc. Nephrol. 21(2): 212-222 (2010).
- Livak, K. J. a Schmittgen, T. D.: Methods 25(4): 402-408 (2001).
- Loeffler, I. a Wolf, G.: Nephrol., Dial., Transplant. 29 Suppl 1: i37-i45 (2014).
- Mariappan, M. M., DSilva, K., Sorice, G., Muscogiuri, G., Jimenez, F., Ahuja, S., Barnes, J. L., Choudhury, G. G., Musi, N. a DeFronzo, R.: Am. J. Physiol. 306(3):C202-11 (2014).
- Marieb, E. N. a Hoehn, K.: Anatomy & Physiology, Pearson, Instock (2014).
- Menini, S., Iacobini, C., Oddi, G., Ricci, C., Simonelli, P., Fallucca, S., Grattarola, M., Pugliese, F., Pesce, C. a Pugliese, G.: Diabetologia 50(12): 2591-2599 (2007).
- Mohamed, R., Jayakumar, C., Ranganathan, P. V., Ganapathy, V. a Ramesh, G.: J. Pathol. 181(6): 1991-2002 (2012).
- Munger, J. S., Harpel, J. G., Gleizes, P.-E., Mazzieri, R., Nunes, I. a Rifkin, D. B.: Kidney Int. 51: 1376-1382 (1997).
- Murphy, M., Crean, J., Brazil, D. P., Sadlier, D., Martin, F. a Godson, C.: Biochem. Soc. Trans. 36(Pt 5): 941-945 (2008).
- Nakagawa, T., Sato, W., Kosugi, T. a Johnson, R. J.: J. Diabetes Res. 2013: 184539 (2013).
- Nangaku, M. a Fujita, T.: Hypertens. Res. 31(2): 175-184 (2008).
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. a Cox, M. M.: Lehninger principles of biochemistry, W.H. Freeman, . New York (2008).
- Nishida, T., Kondo, S., Maeda, A., Kubota, S., Lyons, K. M. a Takigawa, M.: Bone 44(1): 24-31 (2009).
- Novotný, I. a Hruška, M.: Biologie člověka, Fortuna, Praha (2003)

- O'Hern, E. M. a Fishbein, L.: *Mycopathol. Mycol. Appl.* 36(1): 33-41 (1968).
- Ortiz, A., Ziyadeh, F. N. a Neilson, E. G.: *J. Invest. Med.* 45(2): 50-56 (1997).
- Petermann, A. T., Pippin, J., Krofft, R., Blonski, M., Griffin, S., Durvasula, R. a Shankland, S. J.: *Nephron* 98(4): e114-123 (2004).
- Peyroux, J. a Sternberg, M.: *Pathol. Biol. (Paris)* 54(7): 405-419 (2006).
- Pfaffl, M. W.: *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45 (2001).
- Qi, W., Chen, X., Poronnik, P. a Pollock, C. A.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40(1): 9-13 (2008).
- Qi, Z., Fujita, H., Jin, J., Davis, L. S., Wang, Y., Fogo, A. B. a Breyer, M. D.: *Diabetes* 54(9): 2628-2637 (2005).
- Ramesh, G., Kwon, O. a Ahn, K.: *Transplant Proc* 42(5): 1519-1522 (2010).
- Rask-Madsen, C. a King, G. L.: *Nature* 468(7320): 42-44 (2010).
- Reeves, W. B., Kwon, O a Ramesh, G.: *Am. J. Physiol.* 294(4): F731-738 (2008).
- Riser, B. L., Denichilo, M., Cortes, P., Baker, C., Grondin, J. M., Yee, J. a Narins, R. G.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 11(1): 25-38 (2000).
- Romero-Calvo, I., Ocon, B., Martinez-Moya, P., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O. a de Medina, F. S.: *Anal. Biochem.* 401(2): 318-320 (2010).
- Rosenberger, P., Schwab, J. M., Mirakaj, V., Masekowsky, E., Mager, A., Morote-Garcia, J. C., Unertl, K. a Eltzschig, H. K.: *Nat. Immunol.* 10(2): 195-202 (2009).
- Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G. a Egido, J.: *Nephrol., Dial., Transplant.* 21(1): 16-20 (2006).
- Semenza, G. L.: *J. Appl. Physiol.* 88(4): 1474-1480 (2000).
- Semenza, G. L.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(2): 167-171 (2001).
- Semenza, G. L.: *Physiology (Bethesda)* 19: 176-182 (2004).
- Semenza, G. L.: *Sci. Signaling* 2007(407): cm8 (2007).
- Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A. a de Vriese, A. S.: *Kidney Int.* 65(6): 2003-2017 (2004).

- Sivaskandarajah, G. A., Jeansson, M., Maezawa, Y., Eremina, V., Baelde, H. J. a Quaggin, S. E.: *Diabetes* 61(11): 2958-2966 (2012).
- Sun, Y. M., Su, Y., Li, J. a Wang, L. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433(4): 359-361 (2013).
- Susztak, K., Raff, A. C., Schiffer, M. a Böttinger, E. P.: *Diabetes* 55(1): 225-233 (2006).
- Szkudelski, T.: *Physiol. Res.* 50(6): 537-546 (2001).
- Škrha, J., Lebl, J., Pelikánová, T., Tesař, V., Andělová, K., Perušičová, J., Bendlová, B., Broulíková, A., Cinek, O., Čechurová, D. a Haluzík, M.: *Diabetologie*, Galén, Praha (2009).
- Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C.-H. a Keski-Oja, J.: *J. Cell. Biol.* 124(1): 171-181 (1994).
- Tak, E., Ridyard, D., Badulak, A., Giebler, A., Shabeka, U., Werner, T., Clambey, E., Moldovan, R., Zimmerman, M. A., Eltzschig, H. K. a Grenz, A.: *J. Mol. Med. (Berl)* 91(9): 1071-1080 (2013).
- Tan, M., Gu, Q., He, H., Pamarthy, D. Semenza, G. L. and Sun, Y.: *Oncogene* 27(10): 1404-1411 (2008).
- Taylor, B. L. a Zhulin, I. B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(2): 479-506 (1999).
- Tervaert, T. W., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Cook, H. T., Drachenberg, C. B., Ferrario, F., Fogo, A. B., Haas, M., de Heer, E., Joh, K., Noel, L. H., Radhakrishnan, J., Seshan, S. V., Bajema, I. M. a Bruijn, J. A.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 21(4): 556-563 (2010).
- Tran, C. M., Fujita, N., Huang, B. L., Ong, J. R., Lyons, K. M., Shapiro, I. M. a Risbud, M. V.: *J. Biol. Chem.* 288(18): 12654-12666 (2013).
- Van Hoecke, M., Prigent-Tessier, A. S., Garnier, P. E., Bertrand, N. M., Filomenko, R., Bettaieb, A., Marie, C. a Beley, A. G.: *Mol. Cell Neurosci.* 34(1): 40-47 (2007).
- Velagapudi, C., Bhandari, B. S., Abboud-Werner, S., Simone, S., Abboud, H. E. a Habib, S. L.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 22(2): 262-273 (2011).
- Veron, D., Bertuccio, C. A., Marlier, A., Reidy, K., M. Garcia, A., Jimenez, J., Velazquez, H., Kashgarian, M., Moeckel, G. W. a Tufro, A.: *Diabetologia* 54(5): 1227-1241 (2011).

- Verzola, D., Bertolotto, M. B., Villaggio, B., Ottonello, L., Dallegri, F., Salvatore, F., Berruti, V., Gandolfo, M. T., Garibotto, G. a Deferrari, G.: J. Am. Soc. Nephrol. 15 Suppl 1: S85-87 (2004).
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. a Semenza, G. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(12): 5510-5514 (1995).
- Wang, W., Reeves, W. B., Pays, L., Mehlen, P. a Ramesh, G.: Am. J. Pathol. 175(3): 1010-1018 (2009).
- Wolf, G., Butzmann, U. a Wenzel, U. O.: Nephron 93(1): p3-p13 (2002).
- Wolf, G. a Ritz, E.: Kidney Int. 67(3): 799-812 (2005).
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. a Madden, T. L.: BMC Bioinf. 13: 134 (2012).
- Yee Koh, M., Spivak-Kroizman, T. R. a Powis, G.: Trends Biochem. Sci. 33(11): 526-534 (2008).
- Yu, A. Y., Shimoda, L. A., Iyer, N. V., Huso, D. L., Sun, X., McWilliams, R., Beaty, T., Sham, J. S., Wiener, C. M., Sylvester, J. T. a Semenza, G. L.: J. Clin. Invest. 103(5): 691-696 (1999).
- Zhang, C., Yang, F., Cornelia, R., Tang, W., Swisher, S. a Kim, H.: Bone 48(3): 507-513 (2011).
- Ziyadeh, F. N.: J. Am. Soc. Neph. 15(1 suppl): S55-S57 (2004).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

[illegible]

