

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



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Imunohistochemická analýza vlivu TRC105 na proces  
jaterní fibrózy**

**VERONIKA HAMERNÍKOVÁ**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.**


**HRADEC KRÁLOVÉ, 2022**

## Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“ Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této závěrečné práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Hradci Králové dne: 05. 08. 2022

Podpis:

Handwritten signature in black ink, reading "Klára Kovaříková".

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné rady, náměty a vedení při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala panu prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. a Mgr. Martině Vašínové za odbornou pomoc v souvislosti se zpracováním experimentální části diplomové práce.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra biologických a lékařských věd

**Studijní obor:** Farmacie

**Autor:** Veronika Hamerníková

**Vedoucí diplomové práce:** RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

**Název práce:** Imunohistochemická analýza vlivu TRC105 na proces jaterní fibrózy

Diplomová práce se zabývá analýzou exprese biomarkerů jaterní fibrózy jater myši. Cílem práce bylo otestovat účinek léčiva TRC105 (carotuximab) na modelu fibrotizovaných jater po 4 týdenním podávání DDC (3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidin). Byla zkoumána a porovnávána depozice kolagenu a exprese  $\alpha$ -SMA, GFAP a endoglinu. Zvířata byla v experimentu rozdělena do 3 skupin: kontrolní skupina (n=6), DDC skupina (n=6) a TRC105 skupina (n=6). Kontrolní skupina byla krmena standardní dietou, DDC a TRC105 skupině byl v dietě podáván 0,1% DDC. Kontrolní a DDC skupině byl aplikován fyziologický roztok, skupině TRC105 bylo aplikováno léčivo. Analýza exprese pak byla prováděna na fixovaných jaterních řezech. Expres kolagenu byla vyhodnocena barvením Picro-Sirius Red a exprese  $\alpha$ -SMA, GFAP a endoglinu metodou imunohistochemie ve fluorescenčním zobrazení.

Histologické barvení kolagenních vláken Picro-Sirius Red ukazuje, že DDC dieta vyvolává rozvoj jaterní fibrózy. Větší intenzita zabarvení v porovnání s kontrolní skupinou byla pozorována u DDC a TRC105 skupiny. Mezi zabarvením kolagenních vláken u DDC a TRC105 skupiny nebyl vyzorován příliš velký rozdíl. V případě imunohistochemické detekce markerů  $\alpha$ -SMA a GFAP byla intenzita jejich exprese podobná u obou DDC a TRC105 skupin v porovnání s kontrolní skupinou. Expres endoglinu byla u DDC a TRC105 skupiny oproti kontrolní skupině snížena.

Výsledky práce ukazují indukci jaterní fibrózy pomocí DDC, avšak po podávání carotuximabu nedošlo k očekávanému zmenšení plochy fibrotické tkáně. Překvapivě jsme mezi skupinami nezaznamenali změny v expresi markerů, které charakterizují buňky podílející se na rozvoji jaterní fibrózy. Snížená exprese endoglinu u DDC a TRC105 skupiny může naznačovat, že endoglin nehraje klíčovou roli v procesu jaterní fibrózy. Naše výsledky bude potřeba ověřit dalšími metodami, např. Western Blot analýzou.

## Klíčová slova

Jaterní fibróza, Kolagen, TRC105,  $\alpha$ -SMA, GFAP, Endoglin, Imunohistochemie

# Abstract

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department:** Department of Biological and Medicinal Sciences

**Studijní obor:** Pharmacy

**Author:** Veronika Hamerníková

**Supervisor:** RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

**Title of master thesis:** Immunohistochemical analysis of TRC105 effects on the liver fibrosis

The subject of this diploma thesis was the analysis of the expression of liver fibrosis biomarkers in mice liver. The aim of our work was to test the effect of the drug TRC105 (carotuximab) on a fibrotic liver model after 4 weeks of DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-colidine) administration. Collagen deposition and expression of  $\alpha$ -SMA, GFAP and endoglin were examined and compared. Animals were divided into 3 groups: control group (n=6), DDC group (n=6) and TRC105 group (n=6). The control group was fed a standard diet, while the DDC and the TRC105 groups were fed a diet with 0.1% DDC. Physiological solution was administered to the control and DDC groups while carotuximab was administered to the TRC105 group. The analysis of fibrosis biomarker expression was then performed on fixed liver sections. Collagen expression was evaluated by Picro-Sirius Red staining and  $\alpha$ -SMA, GFAP and endoglin expression by immunohistochemistry with fluorescence imaging.

Histological staining of collagen fibers with Picro-Sirius Red showed that the DDC diet induced the development of liver fibrosis. Greater staining intensity compared to the control group was observed in the DDC and TRC105 groups. There was no significant difference between the staining of collagen fibers in the DDC and TRC105 groups. In the case of immunohistochemical detection of markers  $\alpha$ -SMA and GFAP, the intensity of their expression was similar in both DDC and TRC105 groups. Endoglin expression was reduced in the DDC and TRC105 groups.

The comparable intensity of expression of collagen fibers in histological staining and the similar expression of  $\alpha$ -SMA and GFAP markers in DDC and TRC105 groups in immunohistochemical staining, point to the ineffectiveness of the drug TRC105 for preventing liver fibrosis. The reduced expression of endoglin in the DDC and TRC105 groups may suggest that endoglin is not a key factor involved in the development of liver fibrosis.

The results of our work show the induction of liver fibrosis by DDC, but the expected decrease in area of fibrotic tissue did not occur after the administration of carotuximab. Surprisingly, we did not observe changes in the expression of markers that characterize cells involved in the development of liver fibrosis between the groups. The reduced expression of endoglin in DDC and TRC105 groups may indicate that endoglin does not play a key role in the process of liver fibrosis. Our results need to be verified by other methods such as Western Blot analysis.

## Key words

Liver fibrosis, Collagen, TRC105,  $\alpha$ -SMA, GFAP, Endogline, Immunohistochemistry

# OBSAH

ÚVOD .....	8
ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	9
<b>1 JÁTRA.....</b>	<b>10</b>
1.1 HISTOLOGIE JATER .....	10
1.2 FUNKCE JATER.....	13
<b>2 NAFLD (NASH) .....</b>	<b>14</b>
<b>3 JATERNÍ FIBRÓZA.....</b>	<b>17</b>
3.1 PATOGENEZE JATERNÍ FIBRÓZY .....	17
<b>4 MARKERY JATERNÍ FIBRÓZY .....</b>	<b>19</b>
4.1 PŘÍMÉ MARKERY.....	19
4.1.1 Glykoproteiny a polysacharidy .....	20
4.1.2 Kolageny.....	20
4.1.3 Kolagenázy a jejich inhibitory .....	21
4.1.4 Cytokiny a proteomické markery.....	21
4.2 NEPŘÍMÉ MARKERY.....	21
4.2.1 Markery použité v experimentální části .....	22
<b>5 ZVÍŘECÍ MODELY JATERNÍ FIBRÓZY .....</b>	<b>24</b>
5.1 TOXINEM INDUKOVANÁ FIBRÓZA.....	24
5.2 NUTRIČNĚ INDUKOVANÁ JATERNÍ FIBRÓZA .....	25
5.3 FIBRÓZA INDUKOVANÁ IMUNITNÍ REAKCÍ .....	25
5.4 CHOLESTATICKÝ MODEL .....	25
5.5 GENETICKY MODIFIKOVANÉ MODELY.....	26
5.6 DDC MODEL JATERNÍ FIBRÓZY .....	26
<b>6 CAROTUXIMAB (TRC105) .....</b>	<b>26</b>
6.1 STRUKTURA, FUNKCE, FARMAKODYNAMIKA .....	26
6.2 LÉČBA CAROTUXIMABEM .....	27
<b>7 IMUNOHISTOCHEMIE .....</b>	<b>28</b>
<b>8 METODICKÁ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
8.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA.....	30
8.2 HISTOLOGICKÉ A IMUNOHISTOCHEMICKÉ METODIKY .....	30
8.2.1 Příprava řezů pro histologické a imunohistochemické barvení .....	30

8.3	HISTOLOGICKÉ A IMUNOHISTOCHEMICKÉ PROTOKOLY .....	31
8.3.1	Histologický protokol: Barvení Picro-Sirius Red.....	31
8.3.2	Imunohistochemický protokol: Fluorescence $\alpha$ -SMA, GFAP .....	32
8.3.3	Imunohistochemický protokol: Fluorescence-kolokalizace $\alpha$ -SMA/GFAP s endoglinem .....	35
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>38</b>
9.1	REPREZENTATIVNÍ SNÍMKY BARVENÍ SIRIUS RED.....	38
9.2	IMUNOHISTOCHEMIE: REPREZENTATIVNÍ SNÍMKY FLUORESCENCE A-SMA.....	41
9.3	IMUNOHISTOCHEMIE: REPREZENTATIVNÍ SNÍMKY FLUORESCENCE GFAP .....	43
9.4	IMUNOHISTOCHEMIE: REPREZENTATIVNÍ SNÍMKY FLUORESCENCE – KOLOKALIZACE A-SMA S ENDOGLINEM.....	46
9.5	IMUNOHISTOCHEMIE: REPREZENTATIVNÍ SNÍMKY FLUORESCENCE – KOLOKALIZACE GFAP S ENDOGLINEM .....	48
<b>10</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>51</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>58</b>

# ÚVOD

Jaterní fibróza vzniká při procesu reparace tkáně v odpovědi na neustálé poškození a doprovází většinu chronických jaterních onemocnění (Albanis E, Friedman SL, 2001). Je charakterizována značnou depozicí extracelulární matrix (ECM), zejména kolagenu, jako odpovědi na aktivaci mnoha buněčných komponent jater. Játra mohou být poškozena např. na podkladě nealkoholické steatohepatitidy (NASH), virové hepatitidy nebo chronického abúzu alkoholu. Samotná fibróza se po dalším poškození rozvíjí do cirhózy až hepatocelulárního karcinomu. Játra ztrácí svou funkci a zvyšuje se jaterní rezistence, která vyúsťuje v portální hypertenzi (Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, et al., 2004; Brunt EM, 2004).

Během jaterní fibrózy dochází díky rozmanitým signálním kaskádám opravného procesu ke zvýšené expresi různých molekul, které se využívají jako její biomarkery. Mezi tyto biomarkery patří stěžejní molekuly této diplomové práce: kolagen,  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin), GFAP (glial fibrillary acidic protein) a endoglin.  $\alpha$ -SMA je exprimován myofibroblasty a je to specifický marker aktivace diferenciací buněk hladkého svalstva a je využíván k identifikaci aktivovaných jaterních hvězdicovitých buněk (HSCs), které se na myofibroblasty transformují (Cherng S, Young J, Hongbao M, 2008). Expresie GFAP je patrná v klidových a včasně aktivovaných HSCs a je tedy považován za iniciální marker jaterní fibrózy (Carotti S, Morini S, Corradini SG, et al., 2008). Endoglin je glykoprotein podporující skrze TGF- $\beta$  a BMP-9 angiogenezi endotelových buněk (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012; Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al., 1995). Změny v jeho expresi jsou pozorovány u solidních tumorů a v procesu patogeneze jaterní fibrózy (Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al., 2005; Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, et al., 2011). Léčivo carotuximab (TRC105) je chimerická IgG1 monoklonální protilátka, která endoglin váže a tím zamezuje další proliferaci buněk endotelu (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012).



## ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce je histologická a imunohistochemická analýza exprese biomarkerů jaterní fibrózy na řezech myších jater po jejím předchozím navození DDC dietou a možný vliv léčiva carotuximabu na průběh tohoto onemocnění. Exprese kolagenu byla po histologickém barvení vizualizována ve světelném mikroskopu, exprese  $\alpha$ -SMA, GFAP a endoglinu pak pomocí metody imunohistochemie ve fluorescenčním mikroskopu.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 JÁTRA

Játra jsou největším orgánem lidského těla, největší exogenní žlázou a jeden z nejdůležitějších orgánů, který funguje jako centrum metabolismu živin a vylučování odpadních metabolitů. Jejich primární funkcí je kontrola toku látek absorbovaných z trávicího systému před jejich distribucí do oběhu. Jsou také jedinečným orgánem díky jejich dvojímu zásobení krví z portální žíly (přibližně 75%) a jaterní tepny (přibližně 25%) (Sherlock S, Dooley J, 2004).

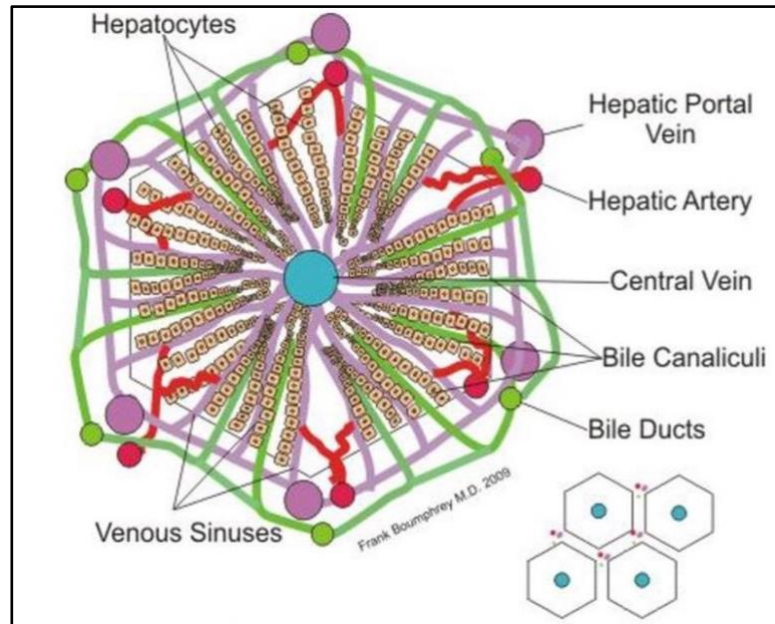
Játra váží přibližně 1,5 kg a tvoří tak 2,5% tělesné hmotnosti dospělého člověka. Leží převážně v pravém horním kvadrantu břicha, kde jsou chráněna hrudním košem a bránicí. Na zadní straně jsou držena systémem mesenterii a připojena k bránici prostřednictvím srpovitého vazů. Většinu jater pokrývá viscerální peritoneum (Sherlock S, Dooley J, 2004).

Jsou rozdělena na 4 laloky: pravý, levý, ocasatý a čtverhranný (lobus dexter, sinister, caudatus et quadratus). V přední dolní části pravého laloku je viditelný žlučník (Sherlock S, Dooley J, 2004).

### 1.1 Histologie jater

Játra jsou heterogenní tkáň obsahující nejméně 15 typů buněk, z nichž největší část tvoří jaterní hepatocyty. Zbytek pak tvoří především endotelové buňky sinusoid, Kupfferovy buňky, jaterní hvězdicovité buňky (HSCs) a epitelové buňky žlučovodů (Sherlock S, Dooley J, 2004; Jones AL, Spring-Mills E, 1983; MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, et al., 2002).

Hlavní funkční jednotkou je lalůček centrální vény (lobulus venae centralis) (Obrázek 1). Má tvar šestibokého hranolu a v jeho centru se nachází centrální véna (vena centralis). Ta je obklopena jaterními trávci (laminae hepaticae). Jaterní trávce jsou tvořeny dvěma řadami hepatocytů s fyziologicky odlišnou apikální a bazolaterální membránou. Mezi hepatocyty probíhají sinusoidy, které jsou konečnými větvemi jaterních cév přivádějících krev do jater. V místě styku 3 sousedních lalůček centrální vény se nachází tzv. portální triáda tvořená interlobulární vénou (vena interlobularis, větev v. portae), interlobulární artérií (arteria interlobularis, větev a. hepatica) a interlobulárním žlučovodem (ductus interlobularis). Centrální véna ve středu lalůčku pak sbírá filtrovanou krev ze sinusoid do větších vén, které ústí do dolní duté žíly (Sherlock S, Dooley J, 2004; Jones AL, Spring-Mills E, 1983; MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, et al., 2002).

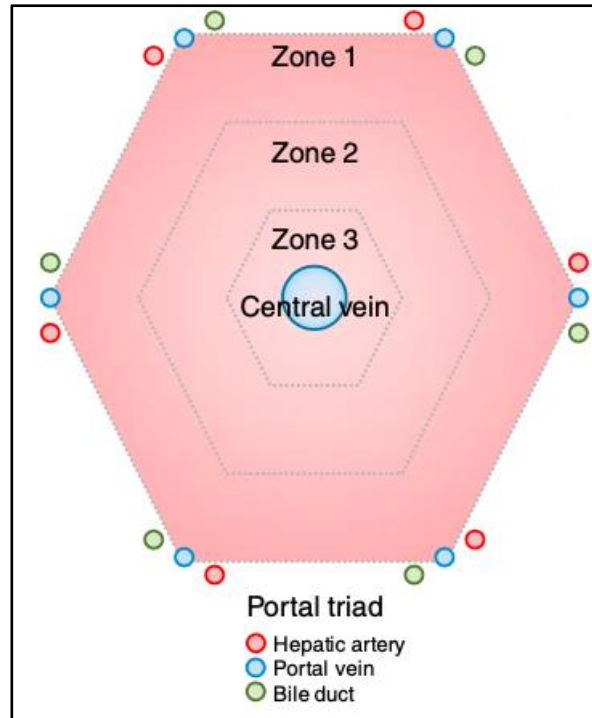


Obrázek 1 – Struktura jaterního lalůčku (lobulus venae centralis)

Obrázek 1 znázorňuje jaterní lalůček s centrální vénou uprostřed a portální triádou – interlobulární véna, interlobulární artérie a interlobulární žlučovod. Hepatocyty tvoří trámce, mezi nimiž probíhají jaterní sinusoidy (převzato z Ozougwu J, 2017).

Prostor mezi endotelovými buňkami sinusoid a sousedící bazolaterální membránou hepatocytů se nazývá Disseho prostor. Endotelové buňky sinusoid jsou fenestrovány a zajišťují bariéru mezi sinusoidami a Disseho prostorem. Tento prostor zabírají mikrokly vyčnívající z bazolaterální membrány hepatocytů, které komunikují s kapilárami a umožňují hepatocytům tak dosáhnout jejich krevního zásobení. Disseho prostor je vyplněn extracelulární matrix (ECM) složenou z kolagenů, proteoglykanů a dalších proteinů, které lemují hepatocyty a tím nahrazují jejich bazální membránu. V Disseho prostoru se dále nacházejí Kupfferovy buňky a jaterní hvězdicovité buňky. Kupfferovy buňky jsou napojeny na endotel sinusoid a filtrují nepotřebný či patologický materiál z cirkulace. Hvězdicovité buňky se nachází mezi hepatocyty a endotelovými buňkami a slouží jako zásobárna tuku. Aktivované HSCs se mohou diferencovat v myofibroblasty a napomáhají regeneraci jater. V Disseho prostoru se dále akumuluje lymfatická tekutina, která je odváděna lymfatickými cévami do portálního kanálu (Sherlock S, Dooley J, 2004).

Na základě funkce a perfúze jsou hepatocyty rozděleny do 3 zón tzv. jaterního acinu (Obrázek 2). Funkce jaterních buněk na periférii acinu, v zóně III, připojených k terminálním jaterním vénám a centrální žíle, jsou odlišné od funkcí v zóně I, kde buňky přiléhají k terminálním jaterním artériím a portálním vénám (Sherlock S, Dooley J, 2004).



Obrázek 2 – Struktura jaterního acinu

Obrázek 2 vyobrazuje jaterní acinus, kde je zóna I napojena na vstupující portální venózní systém a zóna III na terminální jaterní venózní systém (převzato z Trefts E, Gannon M, Wasserman DH, 2017).

Zóna I je považována za periportální oblast hepatocytů a vzhledem k blízkosti k okysličené krvi a živinám jsou zde buňky nejlépe prokrvovány a regenerovány. Díky vysoké perfúzi je zóna I místem oxidativních procesů jako jsou  $\beta$ -oxidace (enzymy Krebsova cyklu), glukoneogeneze, tvorba žluči a cholesterolu a katabolismus aminokyselin. Zóna II je definována jako pericentrální oblast hepatocytů a nachází se mezi zónou I a III. V zóně III dochází k nejnižší perfúzi z důvodu větší vzdálenosti od portální triády. Hraje největší roli v detoxikaci, biotransformaci léčiv, ketogenezi, glykolýze, lipogenezi, syntéze glykogenu a formování glutaminu (enzymy P450). Buňky v zóně III přijímají kyslík jako poslední a jsou náchylné k anoxickému poškození jater (Crawford AR, Lin X, Crawford JM, 1998; Sherlock S, Dooley J, 2004).

Tok žluči je usnadňován žlučovody, které jsou formovány apikálními membránami sousedních hepatocytů. Žluč a krev proudí opačným směrem – játra produkují žluč a ta je kanálky opouští, zatímco krev vstupuje do jater a okysličuje je. Krev odtéká přes lumen sinusoid do jaterní žíly, která leží ve středu lalůčku (Sherlock S, Dooley J, 2004).

## 1.2 Funkce jater

Játra hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech zahrnujících metabolismus makronutrientů, regulaci krevního objemu, podporu imunitního systému, endokrinní regulaci signálních kaskád, homeostázu lipidů a cholesterolu, odbourání xenobiotik a mnoho dalších (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Tvorbou žluči napomáhají játra střevnímu trávení. Žlučové soli jsou nezbytné k emulgaci tuků a tím k jejich zlepšené absorpci ve střevě. Po absorpci tuků se většina žlučových solí vrací zpět do jater enterohepatálním oběhem (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Játra jsou důležitá v metabolismu bilirubinu, který je vedlejším produktem rozpadu starých erytrocytů. Ty jsou játry a slezinou vychytávány. V Kupfferových buňkách jater je hemoglobin rozložen na hem a bílkovinu globin. Globin je recyklován za vzniku nového proteinu a hem se dále postupně enzymatickými procesy odbourává na biliverdin, nekonjugovaný a konjugovaný bilirubin a urobilinogen (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Díky své rozsáhlé cévní síti mohou játra uchovávat velké množství krve a během krvácivých příhod tak udržovat stálý objem tekutin. Kupfferovy buňky v jaterních sinusoidách odstraňují bakterie a cizí částice z portální krve. Játra mají hemostatickou funkci - syntetizují protrombin, fibrinogen a srážecí faktory (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Játra hrají důležitou roli v metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů. Jsou zde syntetizovány tuky ze sacharidů a bílkovin a do krevního oběhu jsou uvolňovány jako lipoproteiny. Játra také syntetizují fosfolipidy a cholesterol které jsou potřebné k jaterní produkci žlučových solí, steroidních hormonů, komponent plasmatických membrán a dalších molekul (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Mezi bílkoviny syntetizované játry patří albumin, který je důležitý k udržování onkotického tlaku. Játra také syntetizují několik neesenciálních aminokyselin a sérových enzymů jako je aspartát aminotransferáza (AST), alanin aminotransferáza (ALT), laktát dehydrogenáza a alkalická fosfatáza (ALP) (Guyton AC, Hall JE, 2006). Ty se využívají jako markery jaterního poškození.

Játra přispívají k udržení stabilních hladin glukózy její produkcí při hypoglykémii a vychytáváním při hyperglykémii a následném ukládání ve formě glykogenu (glykoneogeneze) nebo přeměnou na tuk. Po vyčerpání veškeré zásoby glykogenu mohou játra přeměňovat aminokyseliny a glycerol na glukózu (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Dospělá játra jsou hlavním orgánem zodpovědným za detoxikaci a metabolizaci různých exogenních i endogenních látek přeměnou na látky více hydrofilní, čímž je usnadněna jejich exkrece. Enzymy

zodpovědné za tuto přeměnu látek jsou primárně produkovány hepatocyty a rozděleny do skupin I. a II. fáze. Enzymy I. fáze patří převážně k rodině genů P-450, jejichž funkcí je přidávat polární skupiny k lipofilním molekulám. Hlavní funkcí enzymů II. fáze je pak připojovat ve vodě rozpustnou molekulu kovalentní vazbou k polární skupině, která byla přidána enzymy I. fáze (Guyton AC, Hall JE, 2006).

Játra skladují určité vitaminy a minerály v době jejich nadměrného příjmu, včetně železa a mědi, a dle potřeby je uvolňují. Mohou skladovat vitamin B12 a vitamin D po několik měsíců a vitamin A až po několik let. Uchovávají také vitaminy E a K. Železo je v játrech ukládáno jako feritin, komplex protein-železo, a je uvolňován dle potřeby pro tvorbu erytrocytů (Guyton AC, Hall JE 2006).

Játra jsou hlavním hematopoetickým orgánem v určitých fázích vývoje plodu a zůstávají jím i po narození. Mohou produkovat všechny linie leukocytů z hematopoetických kmenových buněk. Obsahují buňky vrozené a získané imunity, jako jsou Kupfferovy buňky a NK buňky (Guyton AC, Hall JE, 2006; Butura A, 2008).

## 2 NAFLD (NASH)

Nealkoholická jaterní steatóza (NAFLD) je chronické jaterní onemocnění charakterizované inzulinovou rezistencí a akumulací jaterního tuku v játrech při absenci ostatních identifikovatelných příčin akumulace tuku, jako je abúzus alkoholu, virová hepatitida, autoimunitní hepatitida či medikace kortikoidy nebo estrogeny (Ali R, Cusi K, 2009).

Je jednou z hlavních příčin jaterních onemocnění na světě a postihuje nejen játra, ale i další orgánové systémy včetně srdce. Kardiovaskulární choroby jsou pak hlavní příčinou mortality u pacientů s NAFLD (Ali R, Cusi K, 2009; Milić S, Stimac D, 2012).

NAFLD je asociována zejména s obezitou a dalšími prvky metabolického syndromu, malé procento případů vzniká na podkladě specifického genetického polymorfismu. Pacienti s NAFLD mají typické rysy metabolického syndromu jako jsou diabetes mellitus II. typu (DMII), inzulinová rezistence, obezita, ateroskleróza (ATS), dyslipidémie, chronické onemocnění ledvin, zvýšené hladiny kyseliny močové, zvýšení celkového homocysteinu, snížení vit. A, zvýšení hemostatických faktorů a narušená fibrinolýza (Ali R, Cusi K, 2009; Milić S, Stimac D, 2012).

NAFLD je pomalu progredující onemocnění. Nemoc má několik fází progresu: od benigní prosté depozice tuku přes lipotoxicitou způsobenou steatohepatitidu se zánětem (NASH) a fibrózou či bez ní, která může dále progredovat do cirhózy a následně až do hepatocelulárního karcinomu. Prostá steatóza je reverzibilní, zatímco NASH může přecházet v cirhózu (Milić S, Stimac D, 2012).

NASH jako komplikace DMII bývá často přehlížena, neboť není asociována s viditelnými symptomy. Existuje jen málo senzitivních neinvazivních diagnostických metod. Je spoléháno pouze na hladiny jaterních transamináz, které u většiny pacientů zvýšené nejsou. V důsledku toho až u 40% pacientů s NAFLD nastává progresivní jaterní poškození, které není diagnostikováno až do pozdní fáze rozvinutí jaterní choroby (Ali R, Cusi K, 2009). To s sebou nese vážné pozdní komplikace a zvyšuje se tak i riziko úmrtí. Nemoc je nejčastěji diagnostikována náhodně nebo až v momentě, kdy se objeví komplikace (Cusi K, 2009).

Defekty na mnoha úrovních mohou ovlivnit metabolickou rovnováhu v játrech a způsobit tak akumulaci tuku: nadměrná dodávka mastných kyselin a glukózy do jater, intrahepatální nesoulad mezi syntézou lipidů a jejich oxidací, neadekvátní transport do periferních tkání či kombinace všech těchto procesů (Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ, 2008).

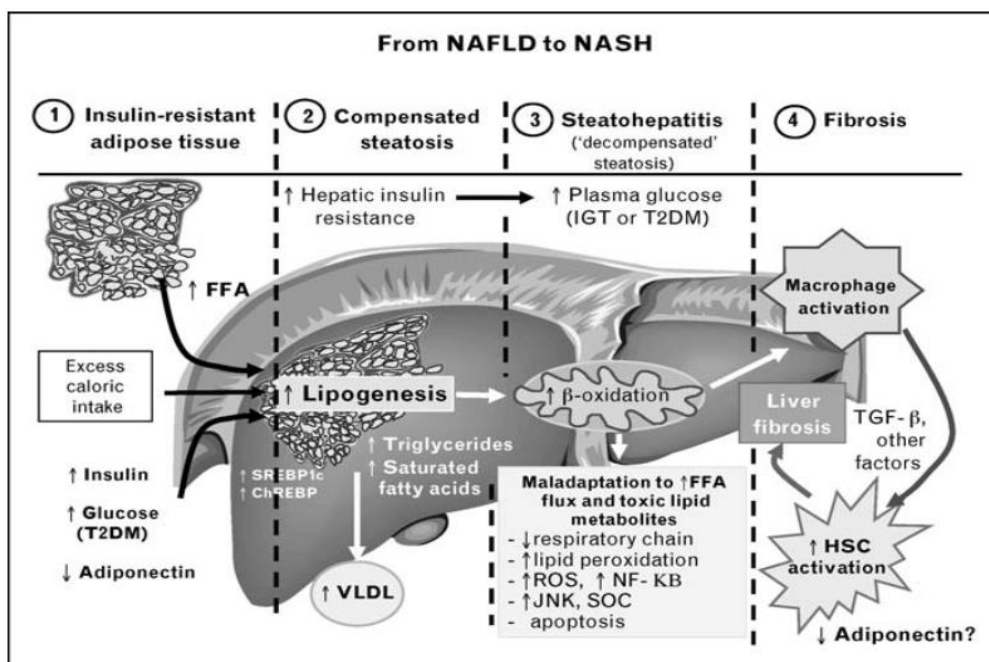
Obezita a DMII sdílí rizikové faktory pro rozvoj lipotoxicity hepatocytů - inzulínovou rezistenci tukové tkáně, subklinický zánět, hyperinzulinémii a abnormální glukózový metabolismus (Cusi K, 2009). Při metabolickém syndromu a/nebo DMII nastává lipolýza a zvyšuje se tak množství volných MK v plasmě v kombinaci s hyperinzulinémií a hyperglykémií, což následně stimuluje extensivní syntézu jaterních triglyceridů a formování toxických satureovaných mastných kyselin (Basaranoglu M, Neuschwander-Tetri BA, 2006; Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, 2008) (Obrázek 3).

První teorie možnosti vzniku NAFLD je založená na podkladě inzulínové rezistence, která způsobuje excesivní dodávku mastných kyselin a triglyceridů do jater a jejich sníženou degradaci. Tak dochází k akumulaci tukových kapének triglyceridů v cytoplasmě hepatocytů a rozvoji steatózy. Kompenzovaná steatóza může zhoršit inzulínovou rezistenci, stimulovat sekreci VLDL a zvýšit mitochondriální B-oxidaci. Při dalším rozvoji nastává steatohepatitida. Mitochondrie se nedokáží adaptovat na zvýšený influx volných MK a dýchací řetězec tak kolabuje (Basaranoglu M, Neuschwander-Tetri BA, 2006; Cusi K, 2009; Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, 2008) (Obrázek 3).

Další možnost vzniku může být multifaktoriální. Nadměrné množství MK v játrech činí játra více náchylná k poškození. Peroxisomální oxidace MK, produkce ROS (Reactive oxygen species) dýchacím řetězcem mitochondrií, metabolismus MK na cytochromu P540 a jaterní metabolismus odbourávání alkoholu může způsobovat jaterní poškození. Obezita také přispívá k dalšímu poškození, kdy tuková tkáň produkuje játra poškozující zánětlivé mediátory jako leptin, TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) a Il-6 (Interleukin 6). Hepatocyty podléhají hypertrofii, agregaci cytoskeletu, apoptóze a nekróze (Basaranoglu M, Neuschwander-Tetri BA, 2006). Dochází k depozici kolagenu způsobené aktivací hvězdicovitých buněk a k portální fibróze v důsledku

proliferace buněk žlučvodů, což následně vede k progresi do NASH. Tyto změny korelují s inzulínovou rezistencí a způsobují progresi steatózy do NASH a fibrózy (Brunt EM, 2004) (Obrázek 3).

Toxické metabolity lipidů aktivují zánětlivé procesy spojené s lipotoxicitou hepatocytů a stimulací chronické nekrózy a zánětu. V dalších krocích nastává fibróza a fibrogenní odpověď. Progrese do cirhózy závisí na velikosti komunikace (cross-talk) mezi hepatocyty, makrofágy a hvězdicovitými buňkami (Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, 2008). Nízké hladiny adiponektinu stimulací syntézy triglyceridů nejspíše podněcují steatózu a fibrózu (Cusi K, 2009) (Obrázek 3).



Obrázek 3 – Progrese inzulínrezistentní adipózní tkáně do NAFLD a NASH

(1) Inzulínová rezistence s hyperinzulinémií, hyperglycémií a lipolýzou triglyceridů z adipózních tkání stimuluje nadměrnou jaterní syntézu triglyceridů a vznik toxických saturevaných mastných kyselin; (2) Kompenzovaná steatóza může zhoršit inzulínovou rezistenci, stimulovat sekreci VLDL a zvýšit β-oxidaci mastných kyselin; (3) Steatohepatitida nastává v případě, kdy se mitochondrie již nedokážou přizpůsobit zvýšeným hladinám mastných kyselin a dýchací řetězec tak kolabuje a toxické metabolity lipidů spouští zánětlivou odpověď; (4) Během fibrózy dochází ke “cross-talku” mezi hepatocyty, makrofágy a HSCs (převzato z Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, 2008).



## 3 JATERNÍ FIBRÓZA

Jaterní fibróza je proces hojení jako odpověď na chronické jaterní poškození a doprovází většinu typů chronických jaterních onemocnění (Albanis E, Friedman SL, 2001). Dochází při ní k nadměrné akumulaci proteinů ECM v jaterní tkáni, zejména kolagenu. Akumulace proteinů ECM zkresluje architekturu jater formováním fibrózních žil a následným rozvojem nodulů regenerujících hepatocytů. Pokročilá jaterní fibróza může progredovat v cirhózu, která poškozuje funkci hepatocytů, dochází ke zvýšení jaterní rezistence, sníženému průtoku krve játry a rozvíjí se portální hypertenze a jaterní insuficience. V konečném stádiu onemocnění se může rozvinout hepatocelulární karcinom. Často vyžaduje transplantaci jater (Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, et al., 2004).

Za hlavní příčinu jaterní fibrózy je dnes považována NASH, dále pak infekce virem hepatitidy a abúzus alkoholu (Ginès P, Cárdenas A, Arroyo V, et al., 2004; Brunt EM, 2004). Cirhóza, hepatocelulární karcinom a portální hypertenze jsou pak následky rozvinuté fibrózy. V konečném stádiu nastává jaterní selhání.

Vzhledem ke stejnému průběhu progresu poškození jater se u všech onemocnění souvisejících s fibrózou mohou vyskytovat stejné symptomy v důsledku postižení mnoha orgánů. Mezi ně patří zejména symptomy GIT, hematologické, renální, plicní, endokrinní a kožní (Sharma B, John S, 2021).

### 3.1 Patogeneze jaterní fibrózy

Jaterní fibróza je asociována s alteracemi v kvantitě a kompozici extracelulární matrix (Albanis E, Friedman SL, 2001; Benyon RC, 2000). V pokročilých stádiích jaterní tkáň obsahuje až 6x více ECM než normální tkáň a obsahuje proteiny jako kolagen (II, III a IV), fibronectin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan a proteoglykany. Jejich akumulace nastává v důsledku jak jejich zvýšené syntézy, tak jejich snížené degradace (Arthur MJP, 2000).

Hlavními producenty ECM jsou jaterní hvězdicovité buňky (Rippe RA, 2003). HSCs jsou distribuovány především v Disseho prostoru a obsahují lipidové kapénky vitamínu A. Během chronického poškození jater se aktivují a diferencují a získávají kontraktilní, prozánětlivé a fibrogenní vlastnosti (Marra F, 1999).

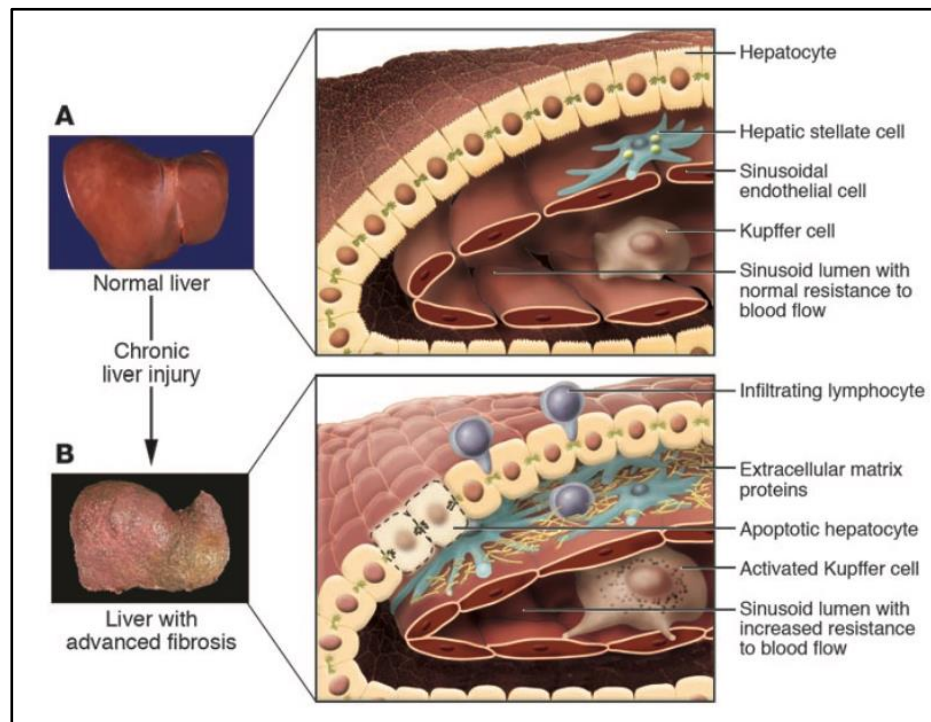
Po aktivaci ztrácejí schopnost uchovávat lipidové částice a vykazují snížení exprese GFAP (glial fibrilary acidic protein) a PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), zatímco zvyšují

expresi  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin). Aktivované HSCs pak migrují z míst poranění tkáně a produkují velké množství extracelulární matrix a mnohých prozánětlivých a profibrotických cytokinů (Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al. 2012).

Během fyziologického procesu mohou být aktivované hvězdicovité buňky podílející se na reparaci tkáně odstraněny apoptózou či inaktivací (Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al. 2012). Při chronickém jaterním poškození dochází nejen k jejich neustálé aktivaci, ale také k zesílení procesu fibrózy přílivem efektorových buněk, čímž se udržuje fenotyp HSCs neustále aktivovaný. Tyto mediátory, jako je např. TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), CTGF (connective tissue growth factor), leptin, IL-6, IL-13 a IL-17 mohou také přímo působit na indukci transkripce genů kolagenu typu I (Kisseleva T, Brenner D, 2021) (Obrázek 4).

Aktivace HSCs je tedy výsledkem interakce mnoha buněk přes mnoho signálních kaskád. Výsledkem je uvolňování ROS a zánětlivých mediátorů.

V důsledku všech procesů, včetně kontrakce aktivovaných HSCs, ztrácejí sinusoidy své fenestrace a dochází tak k omezení průtoku krve, ischemii hepatocytů, zvýšené rezistenci a následné portální hypertenzi (Albanis E, Friedman SL, 2001) (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Změny v architektuře jater asociované s progresí fibrózy

Na Obrázku 4 jsou vidět změny v architektuře jater (A) spojené s pokročilou jaterní fibrózou (B). Po chronickém poškození jater zánětlivé lymfocyty infiltrují jaterní parenchym. Některé hepatocyty podléhají apoptóze. Kupfferovy buňky se aktivují a uvolňují fibrogenní mediátory. HSC proliferují, podléhají dramatické fenotypové aktivaci a vylučují velké množství proteinů extracelulární matrix.

Sinusoidní endotelové buňky ztrácejí své fenestrace a tonická kontrakce HSC způsobuje zvýšenou rezistenci vůči průtoku krve v jaterní sinusoidě (převzato z Bataller R, Brenner DA, 2005).

## 4 MARKERY JATERNÍ FIBRÓZY

Jaterní biopsie je stále považována za zlatý standard při diagnóze a klasifikaci jaterní fibrózy a poskytuje informace i o dalších poškozujících procesech, jako je např. nekróza, zánět a steatóza (Bedossa P, Dargere D, Paradis V, 2003).

Nevýhodou jaterní biopsie je její vysoká invazivnost související s rizikem bolestivosti, hypertenze, krvácení, poškození žlučového systému až smrti (Lee S, 2014). Tato rizika vedla k vývoji neinvazivních diagnostických postupů - biomarkerů jaterní fibrózy. Mimo minimální invazivnost patří mezi jejich další výhody také snadná aplikovatelnost, mezilaboratorní reprodukovatelnost a široká dostupnost (Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S, 2005).

Sérové markery se dělí na přímé a nepřímé. Přímé biomarkery reflektují depozici nebo eliminaci ECM v játrech a zahrnují různé fragmenty složek ECM, které jsou produkovány buňkami tkáně jater během procesu remodelace jaterní tkáně. Jejich sérové hladiny jsou zvyšovány s rozvíjející se fibrózou a klesají v odpovědi na léčbu. Sérové hladiny korelují se stádiem fibrózy a stupněm zánětu. Nepřímé markery pak zahrnují molekuly, které jsou během procesu fibrogenese syntetizovány, indukovány zánětem nebo uvolňovány játry do krve (Grigorescu M, 2006). Přímé a nepřímé markery mohou být použity samostatně nebo v kombinaci a stanovují se rutinními laboratorními testy (Baranova A, Lal P, Biredinc A, et al., 2011).

### 4.1 Přímé markery

Přímé markery mohou být klasifikovány dle jejich struktury na glykoproteiny a polysacharidy, kolagenázy a jejich inhibitory, kolageny a cytokiny (Afdhal NH, Nunes D, 2004).

### 4.1.1 Glykoproteiny a polysacharidy

Mezi glykoproteiny a polysacharidy patří např. hyaluronová kyselina, laminin a chondrex.

Hyaluronová kyselina je glykosaminoglykanová komponenta ECM syntetizována hvězdovitými buňkami. Za normálních okolností endotelové buňky jaterních sinusoid přímo zasahují do jejího vychytávání a degradace. Zvýšené hladiny tak značí její sníženou eliminaci nebo zvýšenou produkci a jsou detekovány v séru pacientů s onemocněním jater různé etiologie, zejména pak u pacientů s cirhózou. Sérové hladiny korelují se stadiem fibrózy a zánětu (Lee S, 2014).

Laminin je nekolagenní glykoprotein syntetizován HSCs a deponován v bazálních membránách jater. Během jaterní fibrózy se laminin koncentruje ve vyšším množství kolem cév, v perisinusoidálním prostoru a portální triádě. Hladiny jsou u jaterní fibrózy zvýšené bez ohledu na etiologii a korelují s její závažností a zánětem jater (Walsh KM, Fletcher A, MacSween RNM, et al., 2000).

Chondrex (YKL-40, Chondrex, human cartilage glykoprotein-39) je růstový faktor fibroblastů, chondrocytů a synoviálních buněk a je produkován HSCs, makrofágy a aktivovanými neutrofily (Saitou Y, 2005).

### 4.1.2 Kolageny

Ve zdravých játrech se nejvíce vyskytuje kolagen typu I a III a integruje se do ECM. Během fibrogenese se hladiny kolagenu I zvyšují až 8x a mění se také poměr kolagenu I a III na 1:2 z původního poměru 1:1 (Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM, 2007).

Během syntézy kolagenu podstupuje prokolagen enzymatické štěpení koncového aminu a karboxylu prokolagen N peptidázou (PIINP) a prokolagen C peptidázou (PICP) (Nielsen MJ, Kazankov K, Leeming DJ, et al., 2015). Peptidázy jsou vylučovány do séra a sérové hladiny tak odráží proces ukládání kolagenu do ECM. Tyto markery však nejsou specifické jen pro játra, jejich hladina může být zvýšena také u plicní fibrózy, revmatických onemocnění, chronické pankreatitidy a akromegalie (Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM, 2007).

Mezi další kolageny, které jsou součástí ECM a jsou využívány jako biomarkery patří např. undulin a tenascin (Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, et al., 2018).

### 4.1.3 Kolagenázy a jejich inhibitory

Mezi kolagenázy a jejich inhibitory se řadí matrixové metaloproteinázy (MMPs) a inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs). MMPs jsou enzymy, které značí degradaci ECM. U člověka jsou exprimovány tři typy MMPs – MMP1 (kolagenázy), MMP-2 (gelatináza A), a MMP-9 (gelatináza B). Jsou syntetizovány intracelulárně, sekretovány ve formě proenzymů a inhibovány TIMPs (Grigorescu M, 2006).

### 4.1.4 Cytokiny a proteomické markery

Do této skupiny patří např. TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ ) a PDGF (platelet derived growth factor) (Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, et al., 2018).

TGF- $\beta$ 1 je cytokin podílející se na regulaci růstu tkání, diferenciaci, produkci ECM a imunitní odpovědi. Existují tři isoformy tohoto cytokinu ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3), ale pouze  $\beta$ 1 se podílí na fibrogenézi. Je sekretován v inaktivní formě a má pleiotropický efekt skrz membránové receptory. Při jaterním poškození stimuluje produkci ECM hvězdčovitými buňkami a inhibuje růst a proliferaci hepatocytů. Jeho hladiny úzce korelují s progresí fibrózy (Nelson DR, Gonzales – Peralta RP, Qian K, et al., 2003).

PDGF je exprimován destičkami, fibroblasty, endotelovými buňkami, mastocyty a makrofágy. Je hlavní podjednotkou stimulující proliferaci a migraci HSCs. Jeho sérové hladiny korelují se závažností jaterní fibrózy (Zhou J, Deng Y, Yan L, et al., 2016).

## 4.2 Nepřímé markery

Nepřímé markery reflektují alteraci jaterních funkcí. Mezi ně patří aminotransferázy (AST, ALT), alkalická fosfatáza (ALP),  $\gamma$ -glutamyltransferáza (GGT), albumin, bilirubin a protrombinový čas.

Kombinace různých markerů může zlepšit senzitivitu a specifitu těchto testů (Baranova A, Lal P, Biredinc A, et al., 2011). Vypočítávají se pomocí matematických vzorců a jsou to např. AST/platelet ratio (APRI), Bonaciniho index, Fib-4 skóre, Hepa skóre Fibro index, FibroTest, Fornsvův index či PGA index (Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, et al., 2018).

Aminotransferázy jsou jaterní enzymy, které jsou uvolňovány do krve poškozenými hepatocyty a jejich hladiny jsou zvyšovány při poškození buněčné integrity. ALT je pro jaterní poškození více specifická a změny její aktivity přetrvávají déle než aktivita AST. Při jaterním poškození může jejich

aktivita dosáhnout až 100 násobku horní hranice referenční hodnoty. To však nemá žádný vztah k prognóze a mohou klesat i při progresi onemocnění (Kim WR, Flamm SL, Bisceglie AM, et al., 2008). Poměr AST/ALT >1 predikuje cirhózu, ≤ 1 hepatitidu a > 2 alkoholickou hepatitidu (Giannini E, Risso D, Botta F, et al., 2003). Hladiny ALT a AST mohou být mírně zvýšeny i v souvislosti se svalovými, ledvinnými a srdečními problémy.

ALP metaloproteináza katalyzuje hydrolýzu esterů fosfátu při alkalickém pH. Odpověď jater na jakoukoliv formu obstrukce žlučodů indukují syntézu ALP z kanikulární membrány hepatocytů (Kwo PY, Cohen SM, Lim JK, 2017). Enzym vstupuje do oběhu pro navýšení aktivity enzymu v séru. Elevace bývá výraznější u extraheptální obstrukce než u intraheptální. Aktivita enzymů v séru může dosáhnout 10-12 násobku horní referenční hranice. Onemocnění jater postihující zejména parenchymální buňky, jako je např. infekční hepatitida, typicky vykazují pouze mírné zvýšení nebo dokonce normální hladiny sérové ALP. Zvýšení může být také pozorováno jako důsledek odpovědi na lékovou terapii (Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, 2012).

GGT se podílí na transportu některých aminokyselin a peptidů přes buněčnou membránu pomocí přenosu  $\gamma$ -glutamylové skupiny. Její hladiny jsou zvýšené především u pacientů s alkoholickou hepatitidou, zatímco u infekční hepatitidy dochází pouze k jejich mírnému zvýšení. Hladiny GGT jsou zvýšené během většiny jaterních onemocnění bez ohledu na příčinu, ale její využití je kvůli nedostatečné specifitě omezené. Hladiny mohou být zvýšené také u pacientů užívajících antikonvulziva či některá antidepresiva, která zvyšují jeho syntézu (Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, 2012).

Játra syntetizují albumin dokud nepřesáhne poškození jaterního parenchymu 50%. Poté hladiny albuminu klesají. Plazmatická koncentrace albuminu je však snížena také např. u akutního onemocnění ledvin a tudíž je její měření u jaterní fibrózy využíváno omezeně (Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, 2012).

## **4.2.1 Markery použité v experimentální části**

### **4.2.1.1 GFAP (Glial fibrillary acidic protein)**

GFAP bylo jako intermediární filamentum poprvé nalezeno v astrocytech mozkové tkáně. HSCs (GFAP pozitivní buňky) sdílejí několik vlastností s astrocyty centrálního nervového systému, jako jejich těsné spojení s kapilárami, hvězdovitý tvar a reakce na poranění tkáně (Carpino F, Gaudio E, Marinozzi G, et al., 1981). Je známo, že v centrálním nervovém systému je exprese GFAP po poškození mozku důležitá pro reparaci hematoencefalické bariéry. Analogie mezi HSCs a astrocyty

předpokládá, že exprese GFAP HSCs může být také zapojena do vaskulární remodelace poškozené jaterní tkáně, kde se proces neovaskularizace výrazně zvyšuje během rozvoje jaterní fibrózy (Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al., 2002).

Exprese GFAP je pozorována v klidových nebo částečně aktivovaných HSCs během odpovědi na akutní fázi onemocnění, zatímco během chronických onemocnění dochází k jeho snížení. GFAP je tedy považován za marker iniciální aktivace HSCs. Tak může GFAP predikovat následnou progresi fibrózy, nikoliv však její stadium. Ve tkáni je GFAP spíše difundován (Carotti S, Morini S, Corradini SG, et al., 2008).

#### 4.2.1.2 Alpha Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)

$\alpha$ -SMA je isoforma aktinu exprimovaného myofibroblasty, které hrají důležitou roli ve fibrogenezi. Aktivní myofibroblasty proliferují a syntetizují velké množství ECM. Signifikantní exprese  $\alpha$ -SMA koreluje s aktivací myofibroblastů. Je to specifický marker aktivace diferenciací buněk hladkého svalstva a je proto užíván k identifikaci aktivovaných hvězdicovitých buněk, které vykazují myofibroblastický fenotyp. Je hojně užíván marker aktivace HSCs u chronických jaterních onemocnění (Cherng S, Young J, Hongbao M, 2008).

#### 4.2.1.3 Endoglin

Endoglin (CD105) je transmembránový glykoprotein a funguje jako ko-receptor ligandu TGF- $\beta$ . Je exprimován převážně aktivovanými endotelovými buňkami (Wikström P, Lissbrant IF, Stattin P, et al., 2002). V procesu fibrózy hraje TGF- $\beta$  hlavní roli v indukci produkce mnoha komponent ECM a indukci diferenciací fibroblastů do myofibroblastů, což dále fibrózu zhoršuje (Maring JA, Trojanowska M, Ten Dijke P, 2012). Studie prokázaly možnou roli endoglinu při procesu rozvoje jaterní fibrózy, kdy je exprimován v profibrogeních HSCs. U jaterní fibrózy jsou pozorovány změny v jeho expresi (Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al., 2005; Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, et al., 2011). Endoglin netralizující monoklonální protilátka carotuximab by tak potenciálně mohla zasahovat do patogeneze onemocnění.

Zvýšená exprese endoglinu v proliferujících angiogenních endotelových buňkách je patrná i zejména u solidních tumorů, kde přispívá k jejich růstu a formování metastáz. Léčivo carotuximab je v současné době klinicky testováno pro cílený targeting endoglinu (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012; Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, 1995)

## 5 ZVÍŘECÍ MODELY JATERNÍ FIBRÓZY

Obecně lze zvířecí modely jaterní fibrózy rozdělit dle etiologie na toxinem indukované, nutriční, imunologické, cholestatické a genetické. Některé kategorie se na základě této klasifikace překrývají. Používanými druhy zvířat jsou v pořadí dle četnosti myši, králíci, psi, morčata, prasata a opice. Různé modely vykazují jedinečné vlastnosti v procesu patogeneze fibrózy (Wu J, Norton PA, 2009).

### 5.1 Toxinem indukovaná fibróza

Mezi hepatotoxiny používané k indukci jaterní fibrózy patří ethanol, chlorid uhličitý ( $\text{CCl}_4$ ), dimethylnitrosamin (DMNS), diethylnitrosamin (DEN), thioacetamid (TAA) a D-galaktosamine (GalN). Látky se podávají většinou intraperitoneálně a rozvoj fibrózy se tak spouští za krátkou dobu. Při orální nebo inhalační administraci rozvoj fibrózy trvá déle (Wu J, Norton PA, 2009).

Konzumace alkoholu je celosvětovou příčinou chronického onemocnění jater. V játrech je ethanol metabolizován především alkoholdehydrogenázou a enzymy CYP450. Tento proces je asociován s produkcí ROS, deplecí glutathionu, peroxidací lipidů a zvýšenou syntézou ECM (Beier JI, McClain CJ, 2010). Hlodavci mají přirozenou averzi k alkoholu a tak je podávání ethanolu kombinováno např. s dalšími specifickými dietami, farmakologickými látkami či virovými infekcemi (Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, et al., 2012).

$\text{CCl}_4$  je jeden z nejvíce používaných jaterních toxinů. Jaterní biotransformace  $\text{CCl}_4$  je závislá na enzymu CYP2E1, kdy se tvoří trichlormethylový radikál podílející se na reakci ROS a tím peroxidaci lipidů (Basu S, 2003; Weber LWD, Boll M, Stampfl A, 2008). Dochází tak k poškození hepatocytů a jejich nekróze, degeneraci, zánětlivé infiltraci, proliferaci hvězdicovitých buněk a ukládání ECM (Jiang Z, You D, Chen X, et al., 1992).

DMN a DEN jsou karcinogenní látky. V důsledku jejich biotransformace jsou produkovány ROS, které reagují s nukleovými kyselinami, proteiny a lipidy (Verna L, 1996).

TAA je klasický hepatotoxický reagent používaný k indukci jaterní cirhózy. Ke své toxicitě vyžaduje metabolickou aktivaci katalyzovanou enzymy CYP450 za vzniku oxidu siřičitého (Low TY, Leow CK, Salto-tellez M, et al. 2004). Je pozorováno snížení počtu sinusoidálních fenestrací a formování bazálních membrán v Disseho prostorech (Zimmermann T, Müller A, Machnik G, et al., 1987).



GalN je další hepatotoxin indukující jaterní poškození podobné virové hepatitidě deplecí uridin trifosfátu (UTP) s následným snížením syntézy RNA a membránových proteinů plasmy (Decker K, 1993).

## 5.2 Nutričně indukovaná jaterní fibróza

Dietní modely s deficitem methioninu a cholinu se velmi často využívají při studiu NASH. Tato dieta způsobuje uvolnění mastných kyselin z tukové tkáně a zvýšení produkce triglyceridů, což způsobuje jaterní steatózu a lipotoxicitu (Jha P, Knopf A, Koefeler H, et al., 2014).

Při dietě s vysokým obsahem tuků zvířata přibývají na váze a rozvíjí se tak inzulinová rezistence (Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, et al., 2007).

## 5.3 Fibróza indukovaná imunitní reakcí

Jaterní fibróza může být imunologicky indukovaná mnoha metodami. V játrech myší infikovaných parazitem *Schistosoma mansoni* se rozvíjí granulomy podněcující zvýšení syntézy ECM v důsledku zánětlivé a imunitní odpovědi na vajíčka parazita. Podává se myším subkutánně (Czaja MJ, Weiner FR, Takahashi S, et al., 1989). Fibrózu může dále indukovat např. intravenózní injekce heterologního séra či albuminu nebo intraperitoneální injekce bakteriálních buněčných stěn (Hayashi H, Sakai T, 2011).

## 5.4 Cholestatický model

Podvázání společného vývodu žluči vede k cholestatickému poškození a periportální biliární fibróze. Obstrukce žlučovodů způsobuje zvýšení tlaku ve žlučovodech, zánět a sekreci cytokinů. Tím dochází k rozvoji cholestázy, která dále progreduje do fibrózy. Úmrtnost do 5-6 týdnů limituje metodu na krátkodobé studie jaterní fibrózy, která souvisí s cholestatickým poškozením (Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al., 2008).

## 5.5 Geneticky modifikované modely

Geneticky modifikované modely umožňují bližší vhléd do zapojení specifických proteinů a signálních drah při rozvoji jaterní fibrózy a tím usnadňují výzkum nových potenciálních léčiv (Hayashi H, Sakai T, 2011). Mezi tyto modely patří např. Mdr2 (Mouse multidrug resistance-associated protein 2), vyvolávající sklerózní cholangitidu (Morita S, Tsuda T, Horikami M, et al. 2013).

## 5.6 DDC model jaterní fibrózy

Podávání 0,1% DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) je novým přístupem indukce jaterní fibrózy. Je to porfynogenní látka, která podněcuje syntézu a masivní akumulaci červenohnědého pigmentu protoporfyrinu inhibicí mitochondriálního enzymu ferrochelatasy. Jeho sekrece žlučí je zvýšená, ukládá se v hepatocytech a Kupfferových buňkách a formují se granula ve žlučovodech, která způsobují jejich obstrukci a následnou cholestázu. Dochází také k aktivaci hvězdicovitých buněk a k infiltraci zánětlivých buněk a do 4 týdnů se rozvíjí fibróza (Fickert P, Stöger U, Fuchsbichler A, et al., 2007).

# 6 CAROTUXIMAB (TRC105)

## 6.1 Struktura, funkce, farmakodynamika

Carotuximab (TRC105) je humánní chimerická IgG1 monoklonální protilátka, která s velkou afinitou váže lidský endoglin a neutralizuje ho (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012).

Endoglin je membránový glykoprotein a ko-receptor pro TGF- $\beta$  a BMP-9 a je ve velkém množství exprimován v proliferujících angiogenních endotelových buňkách solidních tumorů. Je důležitý tedy pro růst tumoru a formování metastáz (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012; Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al., 1995). Ukázal se jako užitečný marker pro zobrazení nádorové angioneogeneze a při zobrazovacích metodách jako studium efektu TRC105 na vaskularitu tumoru (Hong H, Yang Y, Zhang Y, et al., 2011).

Podstatou mechanismu je zamezení navázání BMP-9 (bone morphogenetic protein 9). BMP-9 patří do rodiny TGF- $\beta$  a reguluje angiogenezi v endotelových buňkách přes fosforylaci Smad proteinů, které stimulují diferenciaci. Je tak indukována protilátkou dependentní cytotoxicita vedoucí k

apoptóze vaskulárních endotelových buněk, které exprimují endoglin. TRC105 tedy inhibuje angiogenezi, růst tumoru a formování metastáz a patří k novým přístupům léčby karcinomů antiangiogenní terapií (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012; Nolan-Stevaux O, Zhong W, Culp S, et al., 2012).

## 6.2 Léčba Carotuximabem

Protože je endoglin ve velkém množství exprimován v angiogenních endotelových buňkách, je carotuximab jakožto jeho neutralizující protilátka v klinických studiích zkoumán jako další z možností antiangiogenní terapie solidních tumorů, jako je nádor prostaty, vaječnicků, močového měchýře, prsou nebo hepatocelulární karcinom (Paauwe M, Heijkants RC, Oudt CH, et al., 2016).

Nevýhodou antiangiogenních terapií je rezistence, která končí relapsem pacienta. Vysvětlením může být up-regulace alternativních proangiogenních signálních cest. Součástí klinických studií je tedy cílený targeting jak endoglinu, tak VEGF (Vascular endothelial growth factor), čímž se zamezuje nadměrné angiogenezi, zlepšuje se antitumorová aktivita a převažuje klinický benefit. Mezi inhibitory VEGF patří např. bevacizumab, sorafenib, sunitinib a pazopanib (Paauwe M, Heijkants RC, Oudt CH, et al., 2016).

TRC105 je aplikován intravenózně. Jako nežádoucí účinky byly pozorovány anémie, teleangiektázie, mukózní krvácení, bolesti hlavy a infuzní reakce spojené s iniciační dávkou - křeče, bronchospasmus, kopřivka, hypertenze, hypotenze, tachykardie nebo bradykardie. Podáváno ve správných dávkách však TRC105 patří mezi nové dobře tolerované cílené terapie (Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al., 2012).

## 7 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie (IHC) je technika pro tkáňovou diagnostiku a detekci biomarkerů. Je založena na vazbě specifických protilátek na tkáňový antigen ve tkáňových řezech. Antigen je většinou protein nebo glykoprotein lokalizovaný v jednom nebo více kompartmentech buňky, jako je buněčná membrána, cytosol, mitochondrie nebo jádro. Primární protilátka může být monoklonální nebo polyklonální, obvykle třídy IgG, a je získávána imunizací savčího hostitele, jako je myš, králík, koza nebo kůň. Monoklonální protilátky jsou vytvářeny pomocí hybridomových technologií. Většina imunohistochemických metod zahrnuje použití druhově specifických sekundárních protilátek. Polyklonální protilátky pocházejí z různých klonů aktivovaných B-buněk (Ramos-Vara JA, 2005).

Výhodou této metody je korelace přítomnosti antigenu s jeho umístěním v tkáni nebo buňce, což je velmi důležité pro studium funkce buněk jak v normálních, tak patologicky pozměněných tkáních. (Ramos-Vara JA, 2005).

IHC je využívána k diagnóze onemocnění, biologickému výzkumu a vývoji léků. Například s využitím specifických markerů nádoru je IHC využívána k diagnostice, k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení jeho stadia a stupně a k identifikaci původu metastázy. Pro řadu dalších nenádorových onemocnění je IHC používána jako diagnostický nástroj. Při vývoji léku je pomocí IHC testována jeho účinnost detekcí aktivity markerů onemocnění v cílových tkáních (Thermo-Fisher-Scientific).

IHC je založena na imunobarvení tenkých řezů tkání na podložním sklíčku. Reakce protilátka-antigen je vizualizována buď pomocí chromogenní detekce barevného enzymového substrátu nebo fluorescenční detekcí za přítomnosti fluorescenčního barviva. Chromogenní detekce je založena na protilátkách konjugovaných s enzymy. Nejčastěji se používají enzymy křenová peroxidáza (HRP) nebo alkalická fosfatáza (AP), které jsou konjugovány s primárními nebo sekundárními protilátkami. Při inkubaci s vhodnými substráty vede enzymatická aktivita k vysrážení nerozpustných barevných precipitátů v místě lokalizace antigenu. Takové chromogenní precipitační substráty jsou např. DAB. Pro fluorescenční detekci je primární nebo sekundární protilátka konjugována s fluoroforem, který je následně detekován fluorescenční mikroskopií (Thermo-Fisher-Scientific).

Existují dva typy metody – přímá a nepřímá. Protilátka je detekována buď přímo prostřednictvím značky (jako je enzym, fluorescein či kov), která je přímo konjugována s primární protilátkou, nebo nepřímo pomocí značení sekundární protilátky vytvořené proti hostitelskému druhu, typu a subtypu primární protilátky (Abcam).

Přímá metoda je vhodná pro studium vysoce exprimovaných antigenů a není u ní potřeba další inkubační krok se sekundární protilátkou. Nepřímá metoda je vhodná pro všechny antigeny. Její výhodou je, že signál reakce může být dále zesílen a metoda se tím stává citlivější. Pro nepřímou metodu je sekundární protilátka zásadní pro úspěšnou vizualizaci distribuce primární protilátky. Při nepřímé metodě se na řez nejprve aplikuje protilátka proti sledovanému antigenu (Abcam). Sekundární protilátka je pak vytvořena proti zvířeti, ze kterého byla primární protilátka odebrána. Tímto způsobem dochází k vazbě sekundární protilátky na protilátku primární. Při této metodě je sekundární protilátka značena enzymem či fluorochromem (Ramos-Vara JA, 2005).

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 8 METODICKÁ ČÁST

### 8.1 Laboratorní zvířata

Experiment byl proveden na 18 tříměsíčních samcích myší C57BL/6 s váhou 21-28 g, chovaných ve 12 hodinovém cyklu světlo/tma, konzumujících vodu ad libitum. Myši byly rozděleny do tří skupin: kontrolní skupina (n=6), DDC skupina (n=6) a TRC105 skupina (n=6). Zatímco kontrolní skupina byla krmena standardní chow dietou, DDC skupina a TRC105 skupina byly krmeny doplňkovou 0,1% DDC dietou. Během doby experimentu byl kontrolní skupině a DDC skupině injekčně podáván fyziologický roztok (5mg/kg), zatímco skupině TRC105 bylo podáváno léčivo (5mg/kg) 2x týdně s následným usmrcením myší po 4 měsících, odběrem krve a molekulární analýzou vzorků jater. O všechna zvířata bylo pečováno dle protokolů schválených Odbornou komisí Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, pro zajištění vhodných životních podmínek laboratorních zvířat. Všechny provedené experimenty byly v souladu s českým zákonem č. 246/1992 Sb. (Datum: 27. říjen, 2020).

### 8.2 Histologické a imunohistochemické metodiky

#### 8.2.1 Příprava řezů pro histologické a imunohistochemické barvení

Játra byla zamražena v tekutém dusíku a poté nakrájena na kryostatu. Pro barvení a IHC detekci byly náhodně vybrány 2 preparáty z každého zvířete.

## 8.3 Histologické a imunohistochemické protokoly

### 8.3.1 Histologický protokol: Barvení Picro-Sirius Red

Pro zobrazení kolagenních vláken bylo použito barvivo Sirius Red a pro zobrazení jader neředěný roztok hematoxylinu. Pracovní roztok Picro-Sirius Red je 0,1% roztok Sirius Red v nasyceném roztoku kyseliny pikrové v destilované vodě (koncentrace v protokolu). Roztok byl před použitím zfiltrován. Následně byly zobrazené struktury pozorovány pod světelným mikroskopem.

#### **Postup:**

Řezy jsou vyjmuty z mrazícího boxu, poté probíhá proces sušení po dobu 10 minut, následně 15 minutová fixace v acetonu při teplotě -20°C. Následuje proces schnutí po dobu 5 minut. Všechny řezy jsou uloženy do vaničky a ponořeny vždy na 5 minut a to v tomto pořadí: 96% alkohol, 70% alkohol, destilovaná voda. Po dobu 2 minut jsou řezy ponořeny do neředěného hematoxylinu a ponechány pod tekoucí vodou v intervalu 2-5 minut, dokud není dosaženo světle modrého zbarvení. Následně jsou řezy ponechány v barvivo Sirius Red celých 60 minut. Po uplynutí požadovaného času jsou řezy opláchnuty pod pramenitou vodou, v 96% alkoholu a acetonu. Následuje ponoření do odvodňovací řady vždy po dobu 2 minut: aceton-xylén (10:1), aceton-xylén (1:10) a následně 3x xylén (Penta). Na závěr jsou namontovány krycí sklíčka montovacím médiem Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich). Podrobný protokol je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Protokol pro barvení Picro-Sirius Red

<b>Histologický protokol:</b>		
<b>Barvení Picro-Sirius Red</b>		<b>Interval</b>
1.	Vysušení řezů	10 minut
2.	Fixace aceton (uschovaný při teplotě -20°C)	15 minut
3.	Schnutí	5 minut
4.	96% alkohol	5 minut
5.	70% alkohol	5 minut
6.	Destilovaná voda	5 minut
7.	Hematoxylin neředěný	2 minuty
8.	Modrání pod tekoucí vodou	2-5 minut
9.	Picro-Sirius Red	60 minut
10.	Pramenitá voda	Oplach
11.	96% alkohol	Oplach
12.	Aceton	Oplach
13.	Aceton-xylén (10:1) → aceton-xylén (1:10)	2 minuty
14.	3x xylén	2 minuty
15.	Eukitt	

Zdroj: Vlastní zpracování

0,1 g Sirius red do 100 ml nasycené kyseliny pikrové (1,3 g kyseliny pikrové do 100 ml destilované vody a zfiltrvat).

### 8.3.2 Imunohistochemický protokol:

#### Fluorescence $\alpha$ -SMA, GFAP

Pro zobrazení jaterních markerů  $\alpha$ -SMA a GFAP byla použita metoda nepřímé imunohistochemie. Inkubované primární protilátky jsou navázány na antigeny ve tkáních. Pro zobrazení primární protilátky byla použita sekundární fluorescenční protilátka. Zobrazené struktury byly následně zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem.

Koncentrace primárních i sekundárních protilátek již byly nastaveny. Jako primární protilátky byly použity Rabbit Anti-Mouse  $\alpha$ -SMA (1/50, ab5694, Abcam) a Rabbit Anti-Mouse GFAP (1/100, PA5-16291, Invitrogen). Jako sekundární protilátka byla použita CY3 Goat Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc.) pro zobrazení v červené fluorescenci. Pro zobrazení jader bylo použito fluorescenční barvivo Hoescht (1/1000, Sigma-Aldrich, 14533).



**Postup:**

Zmražené řezy jsou vyjmuty minimálně 20 minut před zahájením práce. Rozmražené řezy se nechají na 30 minut fixovat v acetonu při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Následně jsou vysušeny a poté jsou vzorky ohraničeny EtOH perem pro lepší vizualizaci. K oplachu od reagensů jsou řezy promývány v ředěném roztoku PBS (100 ml PBS a 900 ml destilované vody). Řezy jsou inkubovány 20 minut s mlékem (5 g sušeného mléka v 100 ml PBS), čímž dochází k blokaci nespecifické reakce sekundární protilátky. Poté jsou vzorky opět promyté v PBS. Vždy je přidáno 50  $\mu\text{l}$  potřebného roztoku na 1 sklíčko. Inkubace po dobu 60 minut s primární protilátkou naředěnou v BSA na koncentraci dle protokolu (Rabbit Anti-Mouse  $\alpha$ -SMA, Rabbit Anti-Mouse GFAP), následně je nutné opět vzorky omýt v PBS. Je přidána sekundární protilátka (CY3 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody) na 30 minut a omyto v PBS. Nyní je přidáno fluorescenční barvivo Hoechst a po inkubaci jsou vzorky očištěny v PBS. Nakonec montáž krycích sklíček pomocí montovacího média Vectashield® Vibrance™ Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc.). Podrobné protokoly jsou uvedeny v Tabulce 2 a 3.

Tabulka 2 – Protokol pro fluorescenční zobrazení  $\alpha$ -SMA

<b>Fluorescence rabbit anti mouse <math>\alpha</math>-SMA – RED CY3</b>	
<b>Játra – zmražená</b>	
<b>Aceton (<math>-20^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>30 minut</b>
<b>Usušení řezů (RT)</b>	<b>5 minut</b>
<b>Obtažení řezů EtOH perem</b>	
<b>CY3 Goat Anti-Rat IgG protilátka</b>	
1. PBS	5 minut
2. Mléko (5% v PBS)	20 minut
3. Primární protilátka (v BSA) [50 $\mu\text{L}$ /sklíčko]	60 minut
4. PBS	2x5 minut
5. CY3 Goat Anti-Rabbit IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
7. Hoechst (1/1000 v PBS)	25 minut
8. PBS	2x5 minut
9. Vectashield®	
<b>Primární protilátka</b>	
Rabbit Anti-Mouse $\alpha$ -SMA (ab5694)	1/50
<b>Sekundární protilátka</b>	
CY3 Goat Anti-rabbit IgG protilátka	1/100 v BSA

Zdroj: Vlastní zpracování

Tabulka 3 – Protokol pro fluorescenční zobrazení GFAP

Fluorescence GFAP – RED CY3	
Játra - zmražená	
Aceton (-20°C)	30 minut
Usušení řezů (RT)	5 minut
Obtažení řezů EtOH perem	
CY3 Goat Anti-Rat IgG protilátka	
1. PBS	5 minut
2. Mléko (5% v PBS)	20 minut
3. Primární protilátka (v BSA) [50uL/sklíčko]	60 minut
4. PBS	2x5 minut
5. CY3 Goat Anti-Rabbit IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
7. Hoechst (1/1000 v PBS)	25 minut
8. PBS	2x5 minut
9. Vectashield®	
Primární protilátka	
Rabbit anti-Mouse GFAP (PA5-16291)	1/100
Sekundární protilátka	
CY3 Goat Anti-rabbit IgG protilátka	1/100 v BSA

Zdroj: Vlastní zpracování

### 8.3.3 Imunohistochemický protokol: Fluorescence- kolokalizace $\alpha$ -SMA/GFAP s endoglinem

Pro zobrazení  $\alpha$ -SMA a GFAP současně s endoglinem byla použita metoda kolokalizace. Jedná se o metodu nepřímé imunohistochemie. Postup se liší pouze v současné inkubaci primárních protilátek s endoglinem. Inkubované primární protilátky jsou navázány na antigeny ve tkáních. Pro zobrazení primárních protilátek byly použity sekundární fluorescenční protilátky. Zobrazené struktury byly následně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

Koncentrace primárních i sekundárních protilátek již byly nastaveny. Pro kolokalizaci byl využit „koktejl“ primárních protilátek: Rabbit Anti-Mouse  $\alpha$ SMA (1/50, ab5694, Abcam) a Rat Anti-Mouse endoglin (1/100, BD Pharmigen 550546) / GFAP (1/100, PA5-16291, Invitrogen) a Rat Anti-Mouse endoglin (1/100, BD Pharmigen 550546).

Pro zobrazení primárních protilátek  $\alpha$ -SMA a GFAP červenou fluorescencí byla použita sekundární protilátka CY3 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Vector Laboratories, Inc.). Pro zobrazení primární protilátky endoglinu v zelené fluorescenci byla použita sekundární protilátka Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG Antibody (Vector Laboratories, Inc). Pro zobrazení jader bylo přidáno fluorescenční barvivo Hoechst (1/1000, Sigma-Aldrich, 14533). Následně byla provedena montáž krycích sklíček za využití montovacího média Vectashield® Vibrance™ Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc.).

#### **Postup:**

Zmražené řezy jsou vyjmuty z mrazícího boxu minimálně 20 minut před zahájením práce. Řezy jsou ponechány na 30 minut fixovat v acetonu při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Následně probíhá proces vysoušení. Poté jsou vzorky ohraničeny EtOH perem pro lepší vizualizaci. Řezy jsou inkubovány 20 minut s mlékem (5 g sušeného mléka v 100 ml PBS) a poté opět očištěny v PBS. Vždy je přidáno 50  $\mu\text{l}$  potřebného roztoku na 1 sklíčko. Po dobu 60 minut probíhá inkubace směsi primárních protilátek s primární protilátkou naředěnou v BSA na koncentraci dle protokolu (Rabbit Anti-Mouse  $\alpha$ -SMA, Rat Anti-Mouse endoglin / Rabbit Anti-Mouse GFAP a Rat Anti-Mouse endoglin). Vzorky omyty v PBS. Následně byla přidávána sekundární protilátka pro značení  $\alpha$ -SMA / GFAP (CY3 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody) po dobu 30 minut a vzorky promyty v PBS. Poté byla přidána druhá sekundární protilátka pro značení endoglinu (Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG Antibody). Inkubace po dobu 30 minut. Na dobu 25 minut je přidáváno 20  $\mu\text{l}$  fluorescenčního barviva Hoechst. Očištění v PBS. Na závěr montáž krycích sklíček pomocí montovacího média Vectashield® Vibrance™ Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc.). Podrobné protokoly jsou uvedeny v Tabulce 4 a 5.

Tabulka 4 – Protokol pro fluorescenční kolokalizaci  $\alpha$ -SMA s endoglinem

<b>Fluorescence rat anti mouse ENDOGLIN – GREEN Fluorescein 488</b>	
<b>Fluorescence rabbit anti mouse <math>\alpha</math>-SMA – RED CY3</b>	
<b>Játra - zmražená</b>	
Aceton (-20°C)	30 minut
Usušení řezů (RT)	5 minut
Obtažení řezů EtOH perem	
1. PBS	5 minut
2. Mléko (5% v PBS)	20 minut
3. Primární protilátka (v BSA) [koktejl]	60 minut
4. PBS	2x5 minut
5. CY3 Goat Anti-Rabbit IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
6. Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
7. Hoechst (1/1000 v PBS)	25 minut
8. PBS	2x5 minut
9. Vectashield®	
<b>Primární protilátka</b>	
Rat Anti-Mouse endoglin (BD Pharmigen 550546)	1/50
Rabbit Anti-Mouse $\alpha$ SMA (ab5694)	1/100
<b>Sekundární protilátka</b>	
Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG protilátka	1/100 v BSA
CY3 Goat Anti-rabbit IgG protilátka	1/100 v BSA

Zdroj: Vlastní zpracování

Tabulka 5 – Protokol pro fluorescenční kolokalizaci GFAP s endoglinem

<b>Fluorescence rat anti mouse ENDOGLIN – GREEN Fluorescein 488</b>	
<b>Fluorescence GFAP – RED CY3</b>	
<b>Játra - zmražená</b>	
Aceton (-20°C)	30 minut
Usušení řezů (RT)	5 minut
Obtažení řezů EtOH perem	
1. PBS	5 minut
2. Mléko (5% v PBS)	20 minut
3. Primární protilátka (v BSA) [koktejl]	60 minut
4. PBS	2x5 minut
5. CY3 Goat Anti-Rabbit IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
6. Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG protilátka	30 minut
6. PBS	2x5 minut
7. Hoechst (1/1000 v PBS)	25 minut
8. PBS	2x5 minut
9. Vectashield®	
<b>Primární protilátka</b>	
Rat Anti-Mouse endoglin (BD Pharmigen 550546)	1/50
Rabbit Anti-Mouse GFAP (Invitrogen, PA5-16291)	1/100
<b>Sekundární protilátka</b>	
Fluorescein Rabbit Anti-Rat IgG protilátka, mouse adsorbed	1/100 v BSA
CY3 Goat Anti-rabbit IgG protilátka	1/100 v BSA

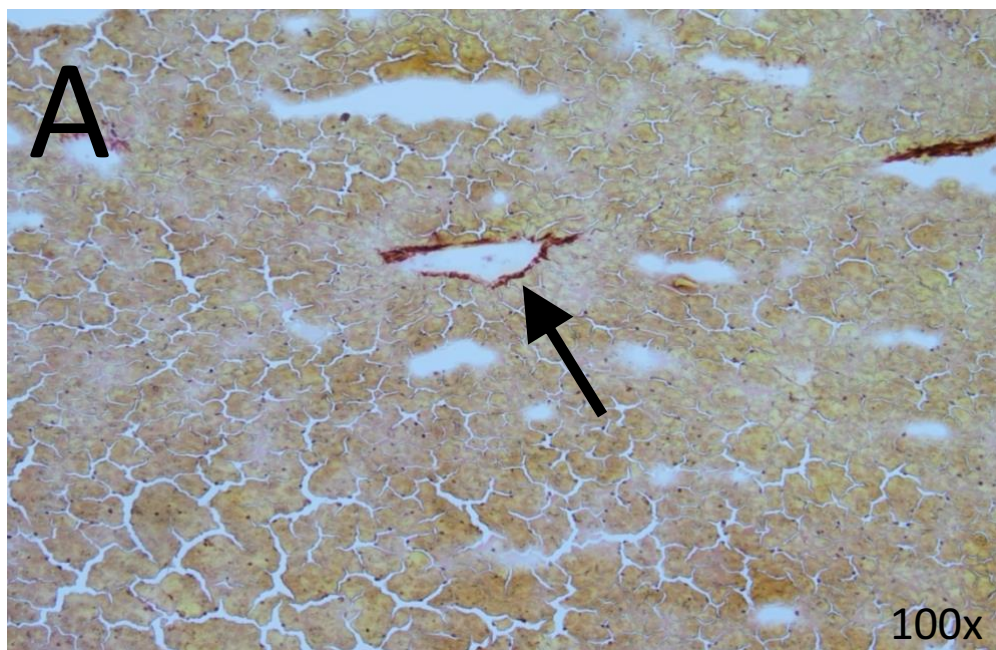
Zdroj: Vlastní zpracování

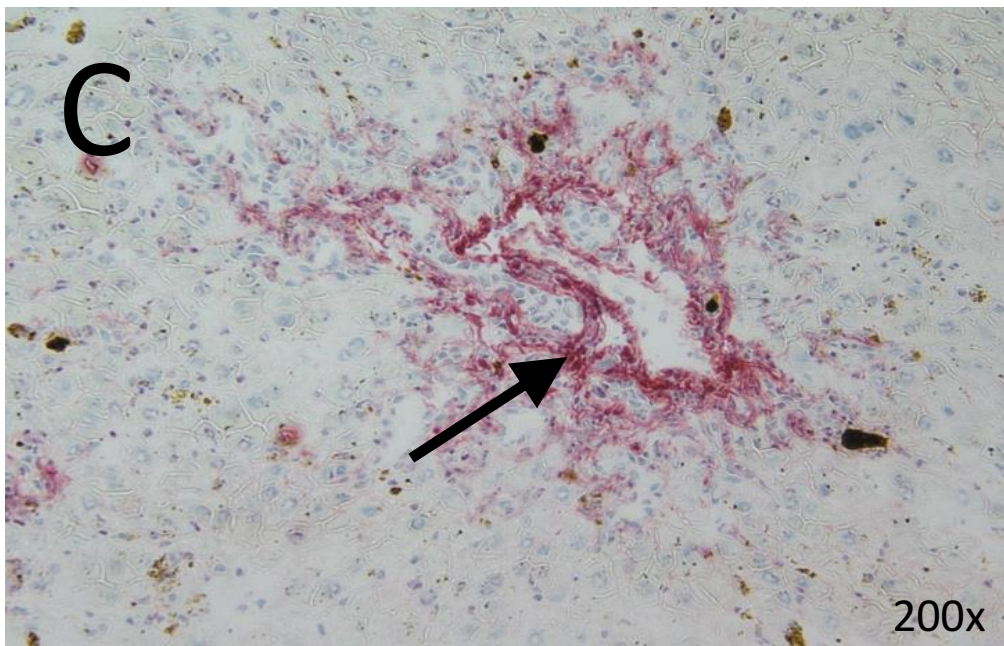
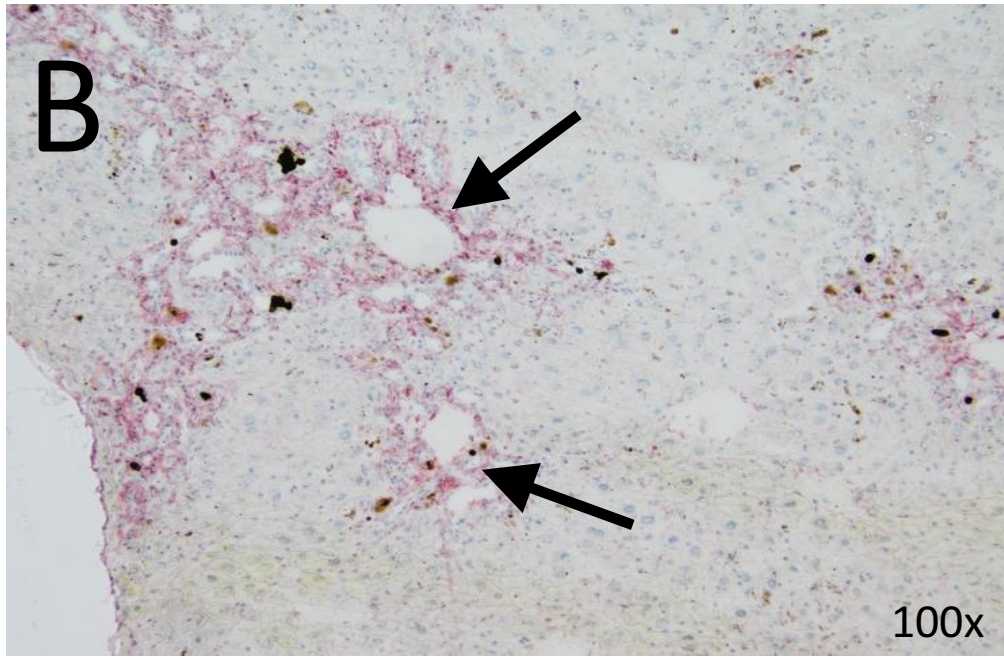
## 9 VÝSLEDKY

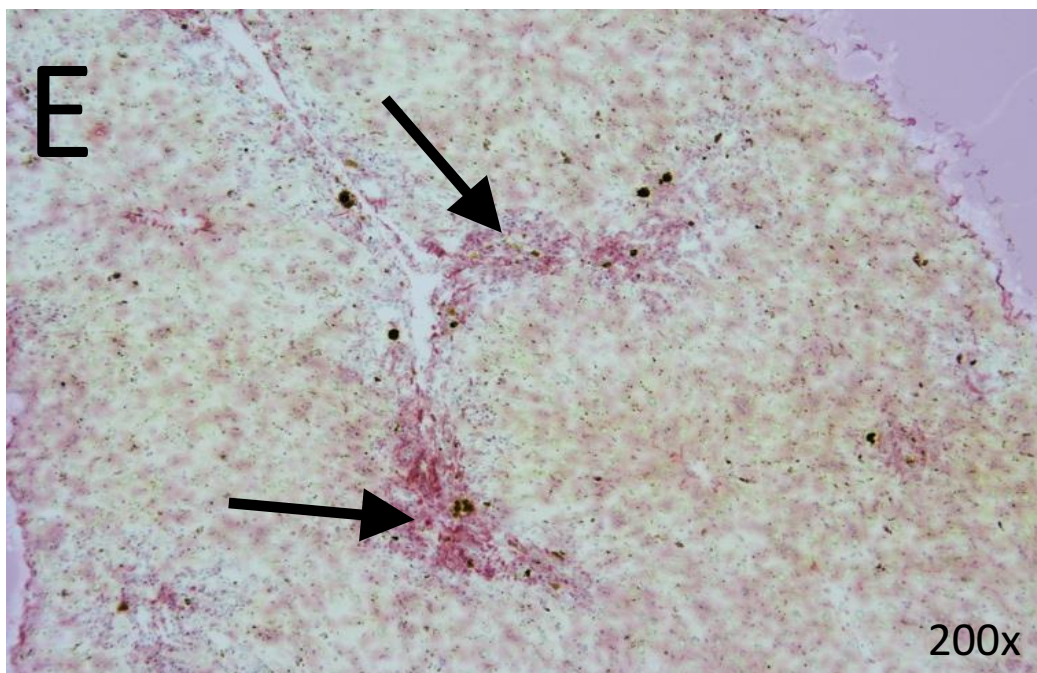
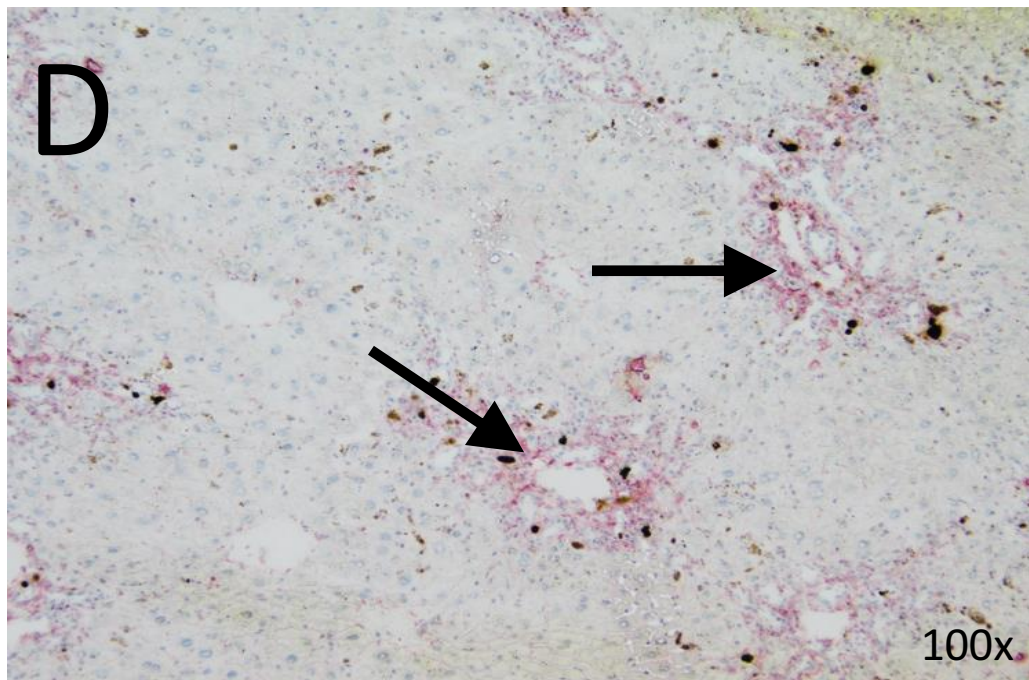
Výsledky histologického a imunohistochemického barvení jsou demonstrovány na reprezentativních snímcích.

### 9.1 Reprezentativní snímky barvení Picro-Sirius Red

Histologická analýza byla provedena na 18 sklíčkách po 2 řezech. Výsledky analýzy přítomnosti kolagenních vláken na tkáňových řezech jater myší jsou demonstrovány na snímcích ze světelného mikroskopu (Obrázek 5 A-E). Kolagenní vlákna jsou patrná u všech skupin (kontrolní, DDC, DDC/TRC105), nicméně u DDC a TRC105 skupiny je v důsledku rozvinuté fibrózy zbarvení mnohem intenzivnější a to zejména v portobiliárních prostorech (Obrázek 5 B-E). Není však pozorován významný rozdíl mezi DDC a TRC105 skupinou.







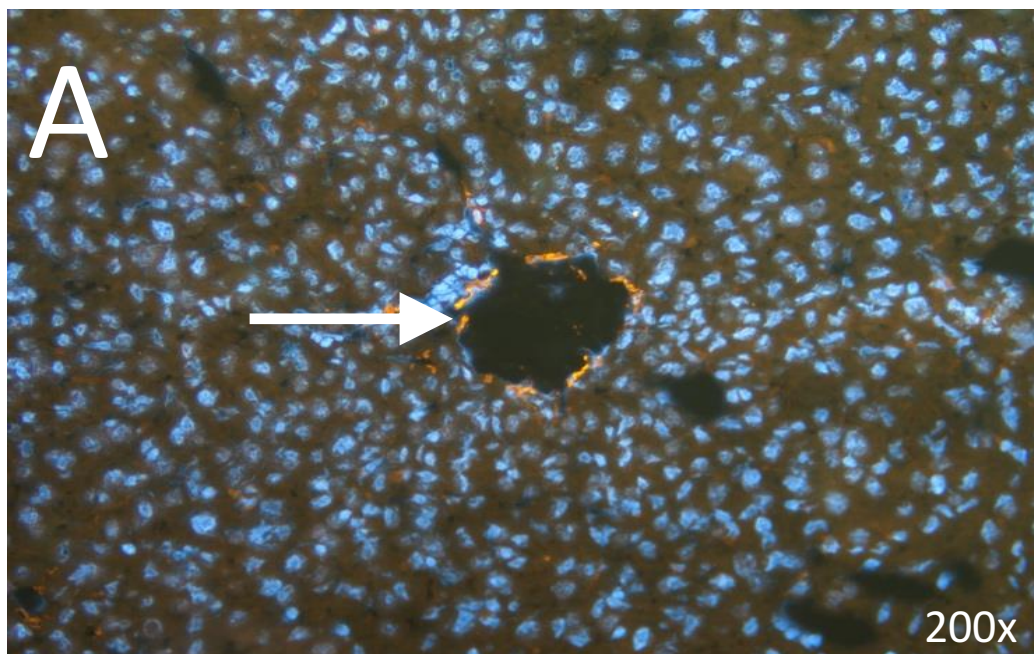
Obrázek 5 - Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u kontrolní (A), DDC (B, C) a DDC/TRC105 (D, E) skupiny

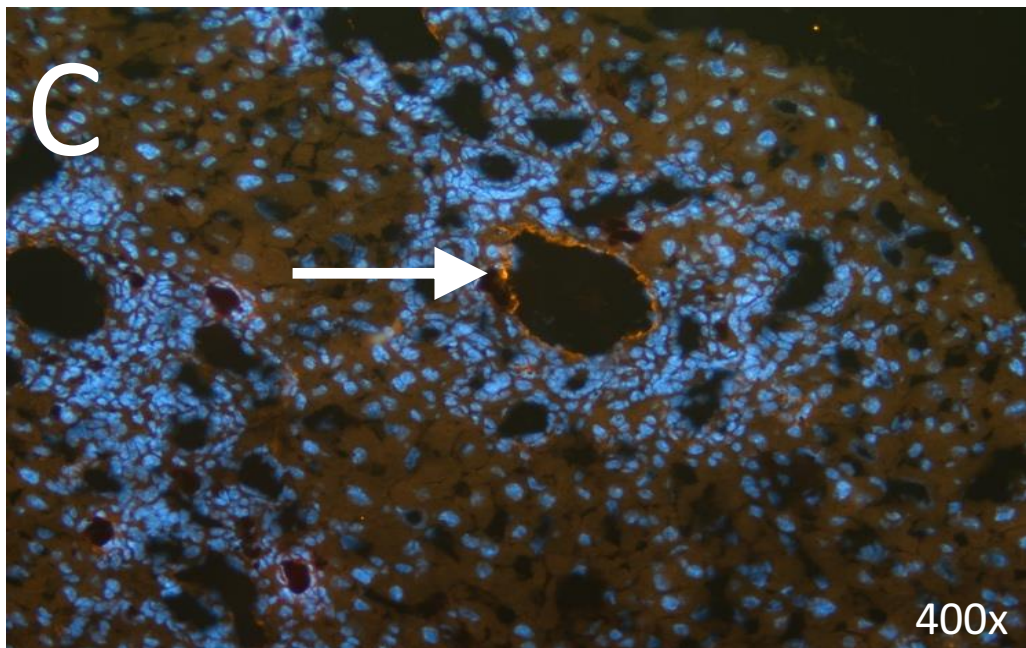
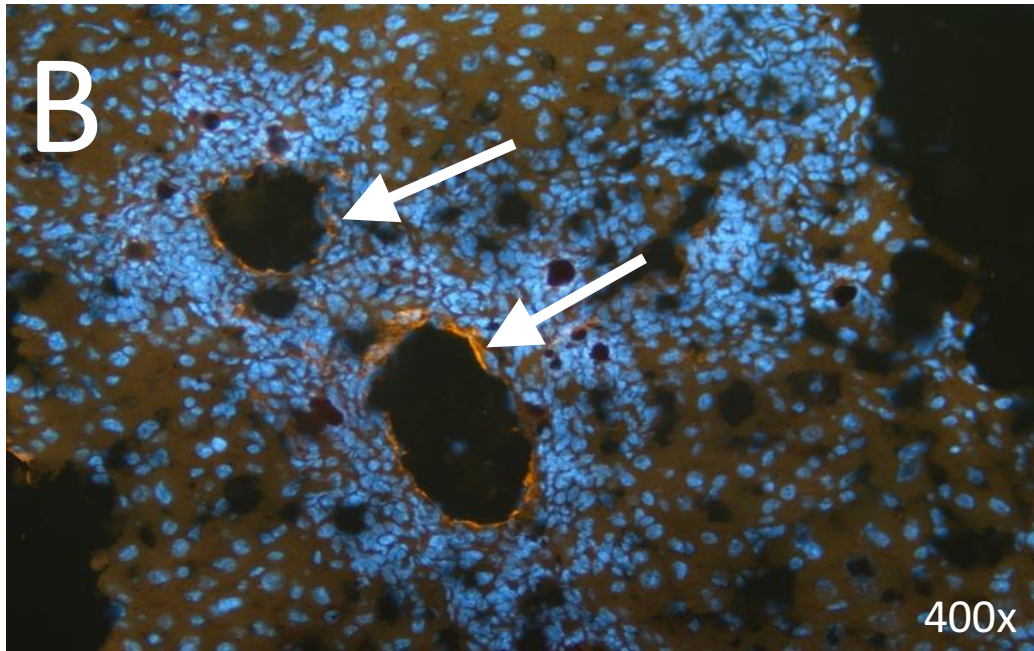
Barvení Picro-Sirius Red detekující kolagenní vlákna (červená barva, černé šipky) bylo viditelné v centrální véně v tunica adventitia u kontrolních zvířat (A). Velmi silné barvení bylo pozorováno v portobiliárních prostorech jater myší, kterým se podávalo DDC (B, C) a DDC/TRC105 (D, E). Nepozorovali jsme signifikantní rozdíl v rozsahu a intenzitě barvení mezi DDC a DDC/TRC105 zvířaty.



## 9.2 Imunohistochemie: Reprezentativní snímky fluorescence $\alpha$ -SMA

Imunohistochemická analýza exprese  $\alpha$ -SMA byla provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. U kontrolních zvířat byla exprese  $\alpha$ -SMA nalezena především v buňkách hladké svaloviny v tunica media portálních vén a artérií (Obrázek 6 A). DDC dieta a léčba TCR105 nijak zvlášť nezměnila intenzitu barvení (Obrázek 6 B, C). Exprese  $\alpha$ -SMA byla přítomna také ve venulách a arteriolách v portálních zónách. Překvapivě žádná výrazná exprese  $\alpha$ -SMA nebyla nalezena v myofibroblastech u obou DDC a DDC/TRC105 skupin v buněčných oblastech, kde jsme detekovali fibrózní kolagenní tkáň (Obrázek 6 B, C)



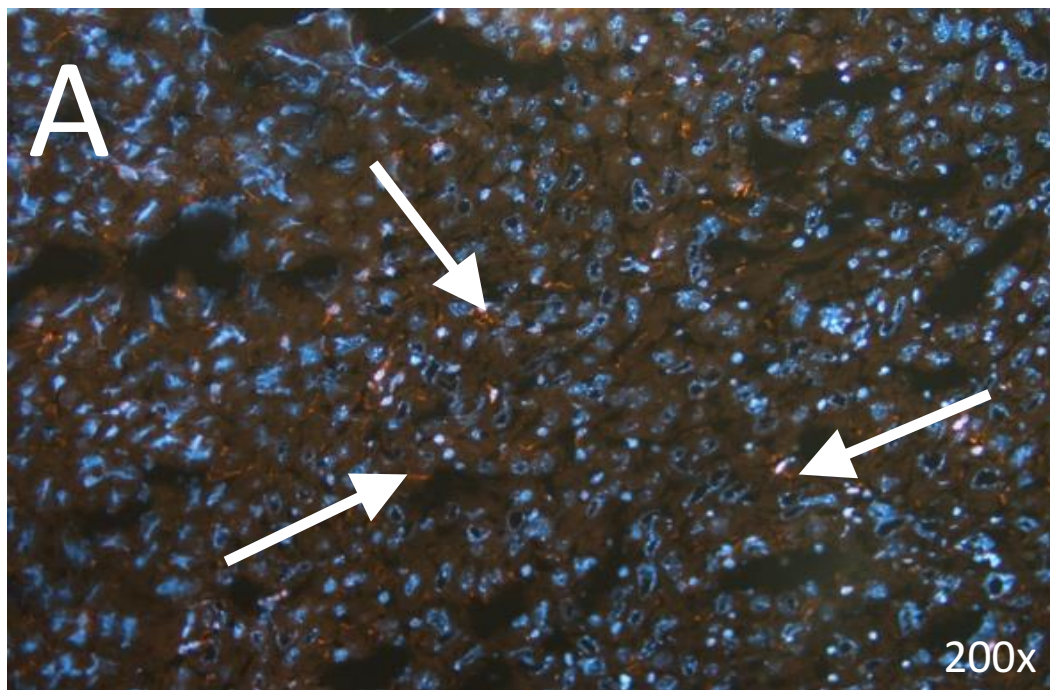


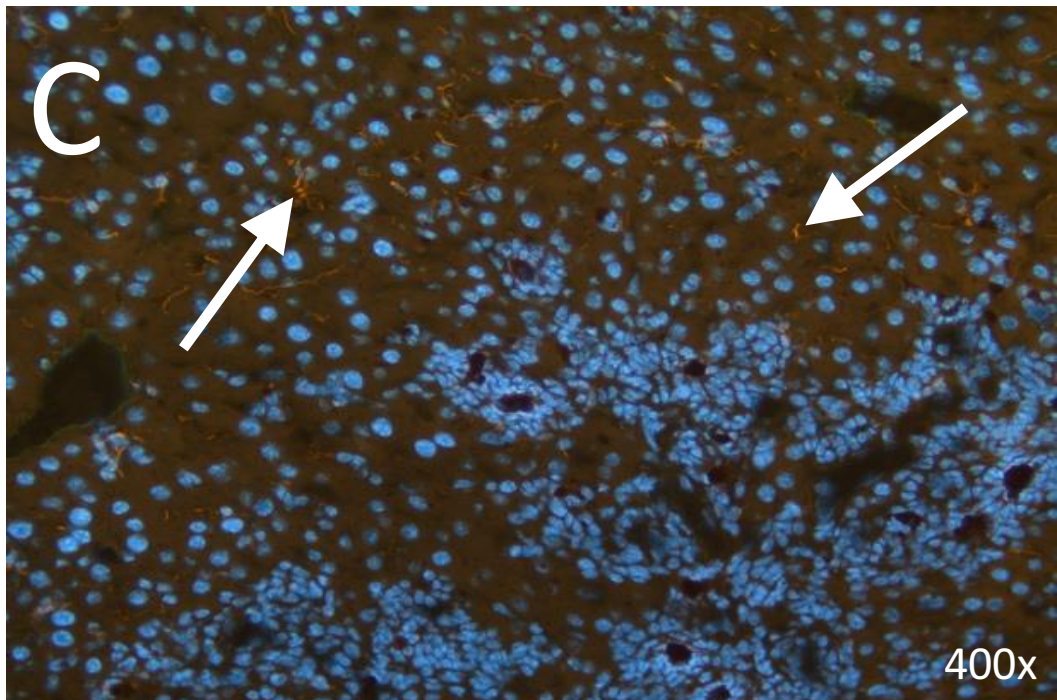
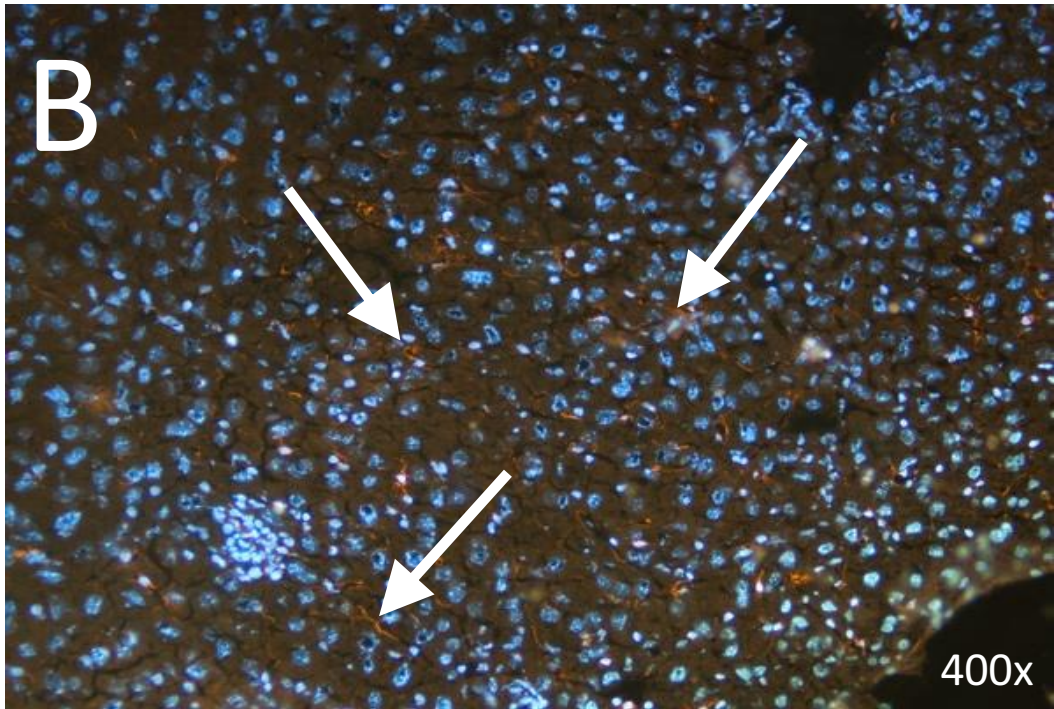
Obrázek 6 – Reprezentativní obrázky detekce  $\alpha$ -SMA u kontrolní (A), DDC (B) a DDC/TRC105 (C) skupiny

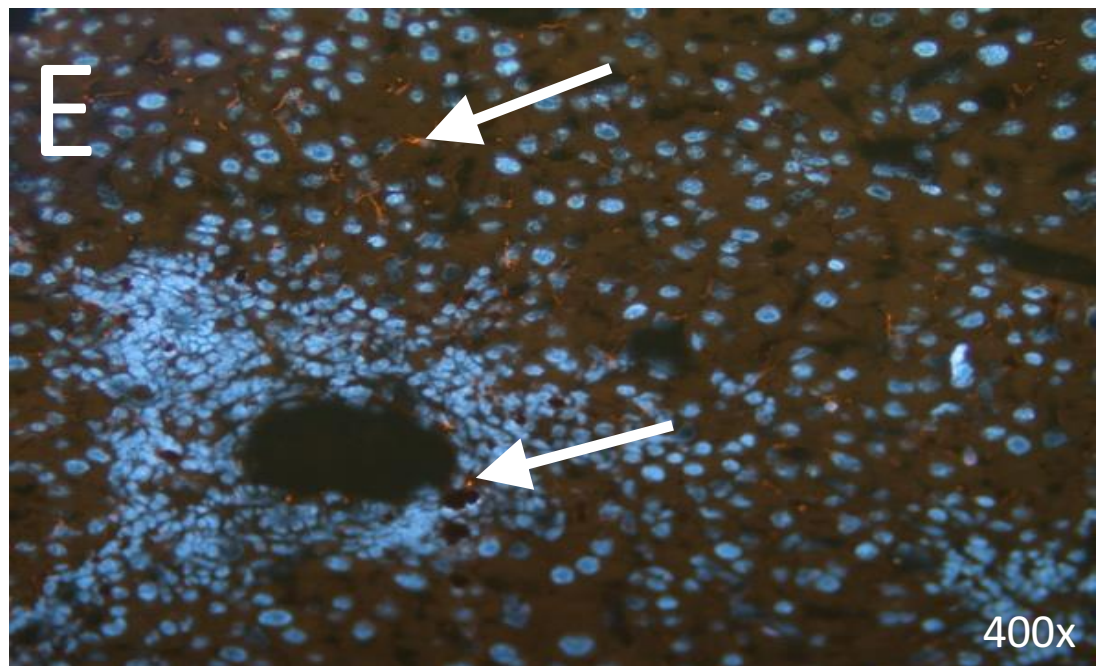
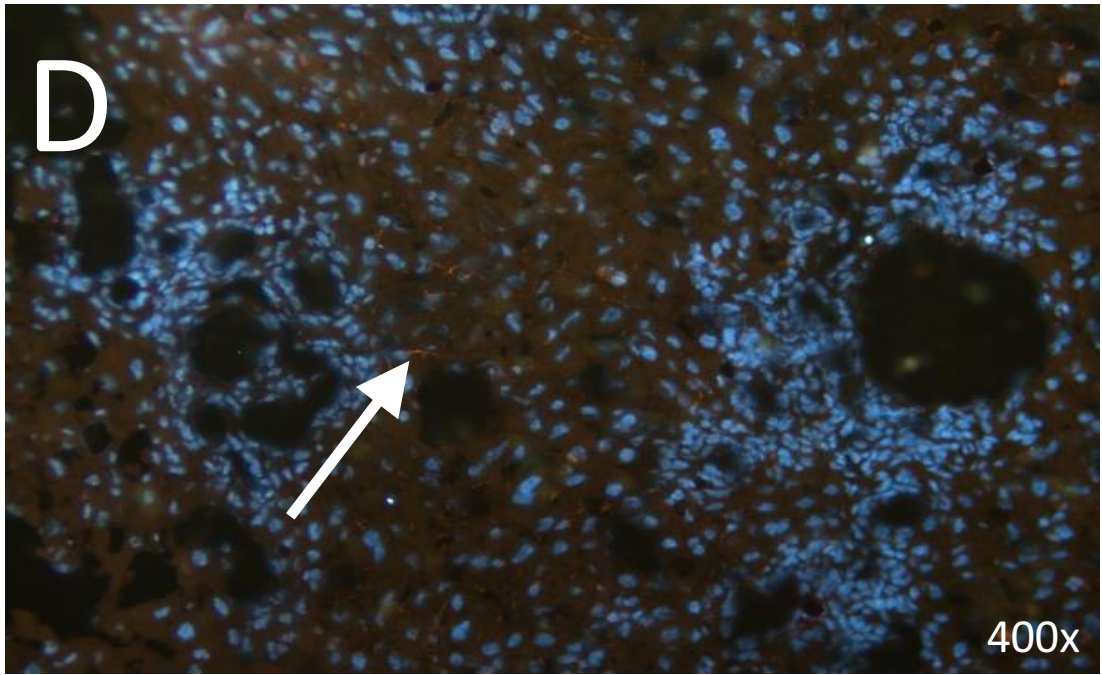
Imunohistochemická analýza kontrolní skupiny (A), DDC (B) a DDC/TRC105 (C). Expres  $\alpha$ -SMA je vyznačena oranžovou barvou a bílými šipkami.

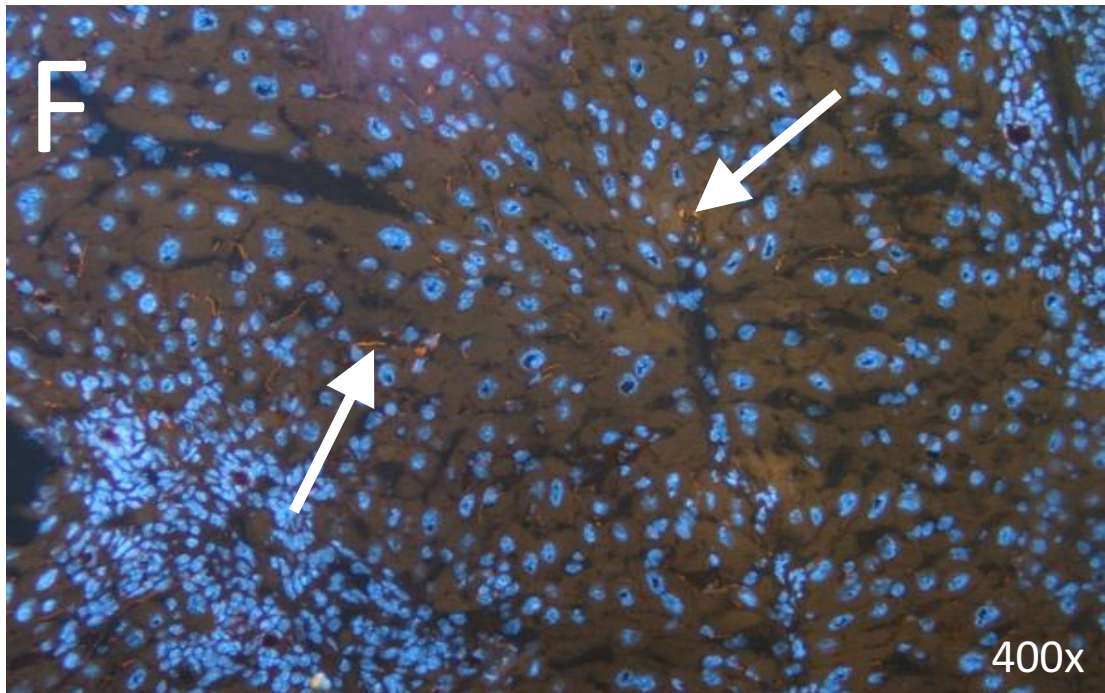
### 9.3 Imunohistochemie: Reprezentativní snímky fluorescence GFAP

Imunohistochemická analýza exprese GFAP byla provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. Slabá exprese GFAP byla pozorována v hvězdicovitých buňkách jater u kontrolních zvířat (Obrázek 7 A, B). DDC dieta (Obrázek 7 C, D) a podávání DDC/TRC105 (Obrázek 7 E, F) příliš nezměnilo intenzitu exprese a lokalizaci GFAP. Exprese byla podobná jako u kontrolní skupiny. V některých řezech byla detekována malá exprese GFAP v místech fibrotické tkáně poukazující na přítomnost hvězdicovitých buněk.







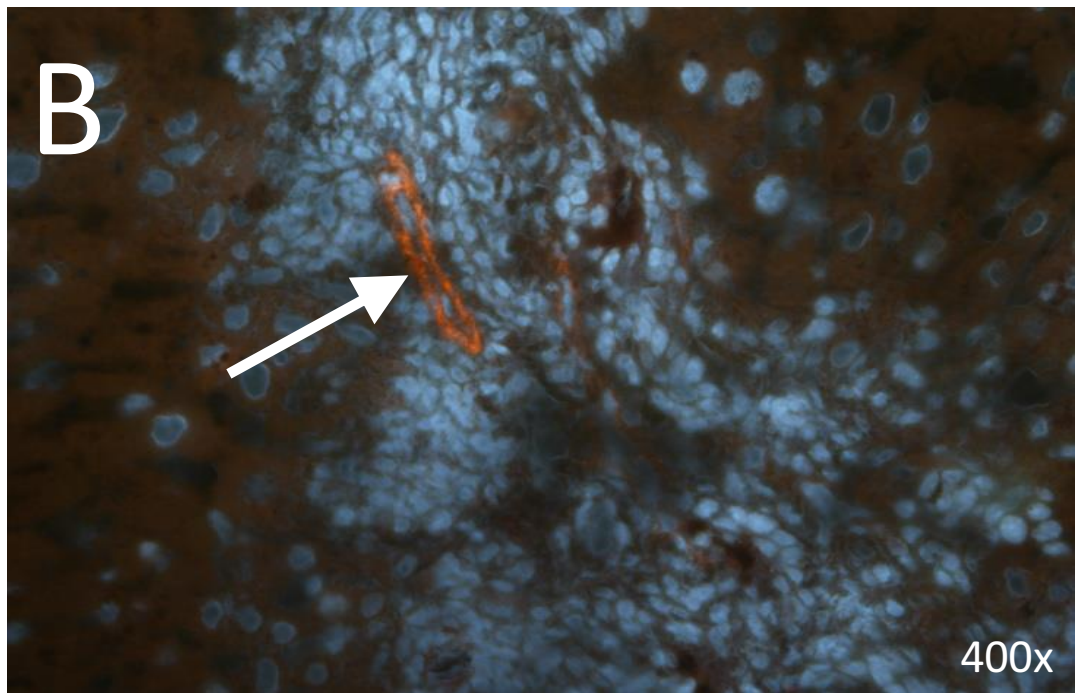
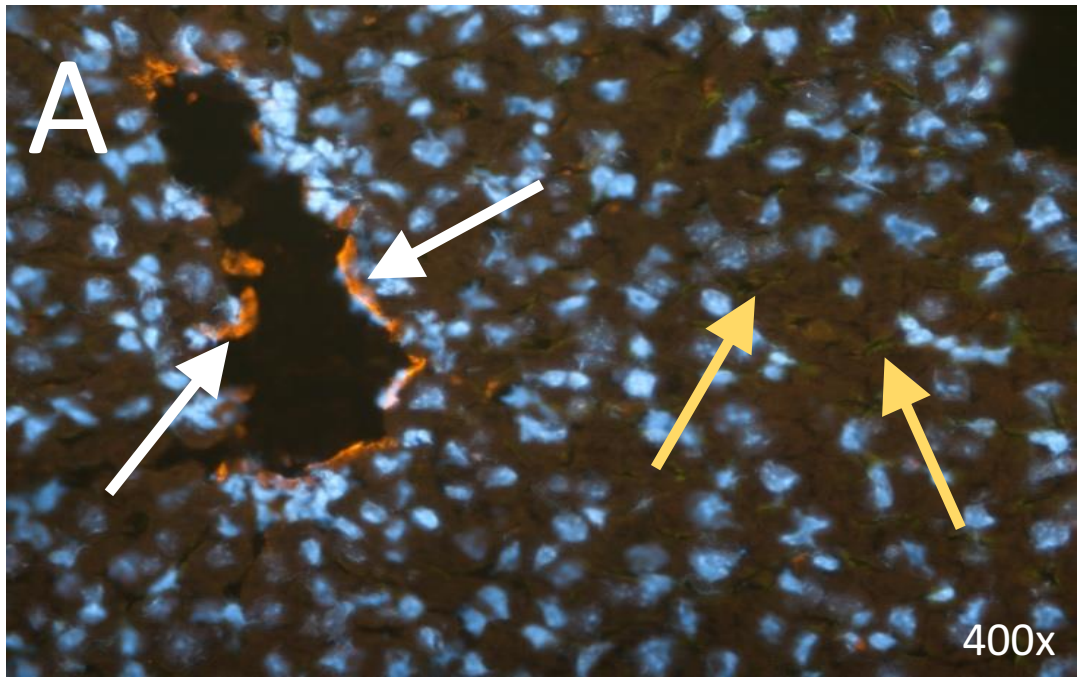


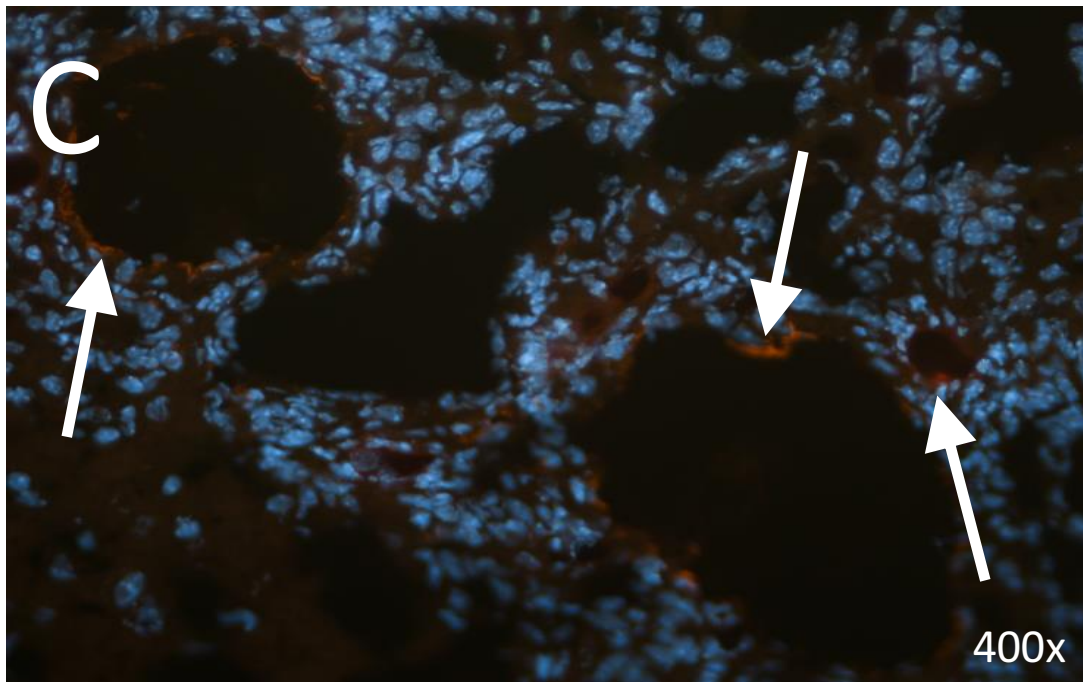
Obrázek 7 – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u kontrolní (A, B), DDC (C, D) a DDC/TRC105 (E, F) skupiny

Imunohistochemická analýza kontrolní skupiny (A, B), DDC (C, D) a DDC/TRC105 (E, F). Expres GFAP je vyznačena oranžovou barvou a bílými šipkami.

## 9.4 Imunohistochemie: Reprezentativní snímky fluorescence – kolokalizace $\alpha$ -SMA s endoglinem

Imunohistochemická analýza kolokalizace  $\alpha$ -SMA s endoglinem byla provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. Fluorescenční detekce ve studovaných játrech neukázala žádnou signifikantní kolokalizaci mezi endoglinem a  $\alpha$ -SMA (Obrázek 8 A-C). Expres endoglinu byla viditelná v endotelových buňkách sinusoid a centrální vény u kontrolních zvířat (Obrázek 8 A). Expres  $\alpha$ -SMA byla detekována ve venulách a arteriolách portobiliárního prostoru. DDC a DDD/TRC105 léčba způsobila velký pokles v expresi endoglinu u obou skupin (Obrázek 8 B, C). Žádná kolokalizace nebyla nalezena v žádném z testovaných řezů.





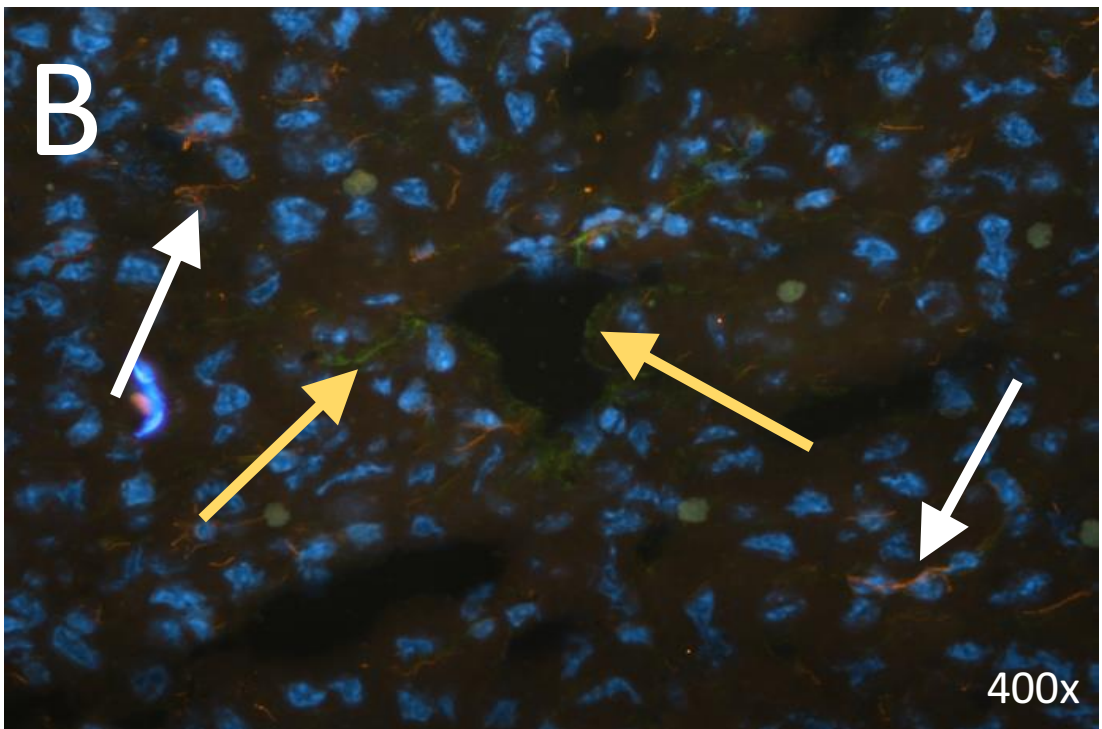
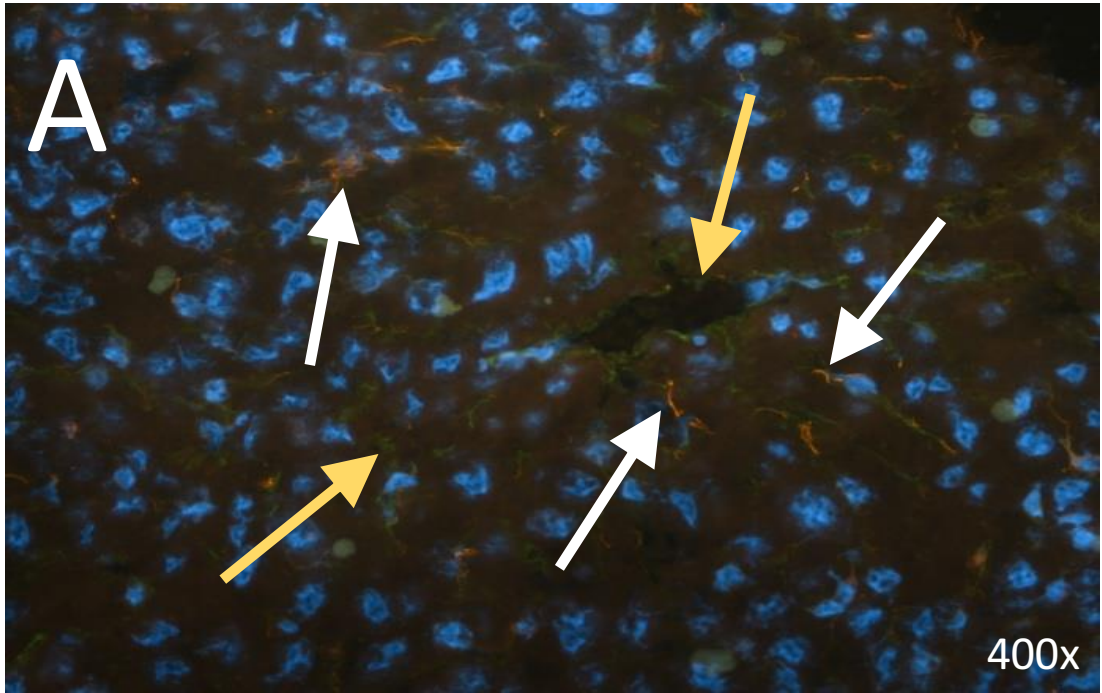
Obrázek 8 – Reprezentativní obrázky kolokalizace  $\alpha$ -SMA a endoglinu u kontrolní (A), DDC (B), a DDC/TRC105 skupiny (C)

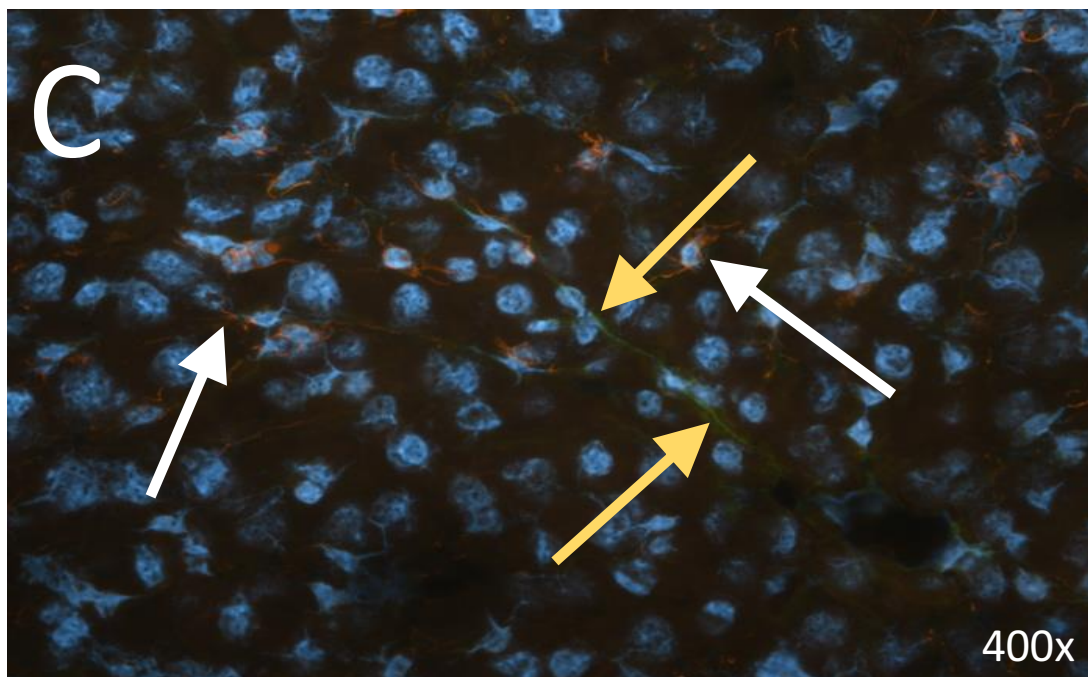
Imunohistochemická analýza kontrolní skupiny (A), DDC (B) a DDC/TRC105 (C). Expres  $\alpha$ -SMA je vyznačena oranžovou barvou a bílými šipkami, exprese endoglinu zelenou barvou a žlutými šipkami (A).

## 9.5 Imunohistochemie: Reprezentativní snímky fluorescence – kolokalizace GFAP s endoglinem

Imunohistochemická analýza kolokalizace GFAP s endoglinem byla provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. Stejně jako u předchozí detekce (Obrázek 8) nebyla nalezena žádná významná kolokalizace mezi GFAP a endoglinem (Obrázek 9). Expres endoglinu byla opět viditelná v endotelových buňkách sinusoid a centrální vény u kontrolních zvířat (Obrázek 9 A). Expres GFAP byla detekována v jaterních hvězdicovitých buňkách. DDC a DDC/TRC léčba pak opět snížila expresi endoglinu (Obrázek 9 B, C).







Obrázek 9 – Reprezentativní obrázky kolokalizace GFAP a endoglinu u kontrolní (A), DDC (B) a DDC/TRC105 (C) skupiny

Imunohistochemická analýza kontrolní skupiny (A), DDC (B) a DDC/TRC105 (C). Expres GFAP je vyznačena oranžovou barvou a bílými šipkami, exprese endoglinu zelenou barvou a žlutými šipkami.

## 10 DISKUSE

Jaterní fibróza je odpověď na chronické poškození jater formováním nadměrného množství extracelulární matrix, zejména depozicí kolagenu. Játra ztrácejí svou původní architekturu a tím funkci a při dalším poškození fibróza progreduje do cirhózy se závažnými důsledky v odpovědi na nefunkčnost jater (Albanis E, Friedman SL, 2001). Důležitou roli hrají HSCs, s jejichž aktivací dochází k indukci zmožení ECM a produkci dalších markerů, které pomocí vzájemné komunikace podněcují její další tvorbu a ukládání. Uvádí se, že aktivované HSCs jsou hlavním zdrojem myofibroblastů, někteří autoři rovněž předpokládají zapojení portálních fibroblastů do procesu transdiferenciace (Kisseleva T, Cong M, Paik Y, et al., 2012).

Bylo prokázáno, že dlouhodobé podávání 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrokolidinu vyvolává onemocnění žlučodů, které může být charakterizováno jejich poškozením, pericholangitidou, peridukturní fibrózou, rozvojem meziportálních sept a zánětem. Fibróza indukovaná DDC byla v naší studii na myších použita k indukci metabolického, toxického a cholestatického poškození, kdy dochází k aktivaci jaterních hvězdicovitých buněk a k jejich přeměně na myofibroblasty, čímž přispívají k rozvoji jaterní fibrózy (Fickert P, Stöger U, Fuchsichler A, et al., 2007).

Léčivo carotuximab je monoklonální protilátka proti lidskému/myšímu endoglinu, který patří do rodiny signální kaskády TGF- $\beta$  a je v současnosti zkoušen jako léčivo antiangiogenní terapie solidních tumorů (Paauwe M, Heijkants RC, Oudt CH, et al., 2016; Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al. 2012).

Nedávné studie ukazují na potenciální roli endoglinu v patologii jaterní fibrózy. Výsledky těchto studií demonstrují profibrotické i antifibrotické účinky endoglinu během poškození jater. Bylo prokázáno, že endoglin je exprimován v HSCs, které představují jaterní buňky s největším profibrogenním potenciálem. Jejich aktivace je jedním z mnoha mechanismů iniciace poškození jater (Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al., 2005; Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, et al., 2011).

Cílem diplomové práce proto bylo otestovat účinek protilátky proti endoglinu – carotuximabu - na jaterní fibrózu u myšího modelu založeného na podávání DDC po dobu 4 týdnů. Práce by měla blíže nastínit expresi markerů fibrózy v plně fibrotizovaných játrech a v játrech léčených TRC105, a zda by bylo léčivo tedy dále použitelné v léčbě jaterní fibrózy.

Pro zobrazení ukládání kolagenu jsme použili metodu barvení Picro-Sirius Red. Kolagen je fyziologicky deponován v menším množství i ve zdravých játrech, tudíž jeho přítomnost byla patrná i u kontrolní skupiny. Dle předpokladu byla pak větší intenzita zabarvení pozorována u DDC a

TRC105 skupiny, u kterých byla fibróza již plně rozvinutá. Zabarvení a tudíž větší depozice byla viditelná zejména v portobiliárních prostorech. Mezi barvením kolagenních vláken u DDC a TRC105 nebyl pozorován značný rozdíl. Léčivo tedy neprokázalo žádný účinek na jaterní fibrózu.

$\alpha$ -SMA je markerem počáteční diferenciace buněk hladkého svalů a identifikuje aktivaci HSCs (Cherng S, Young J, Hongbao M, 2008). Exprese  $\alpha$ -SMA byla patrná u všech skupin zvířat. U kontrolní skupiny byla exprese viditelná v tunica adventitia portálních vén a arteriol. U DDC a TRC105 skupiny překvapivě nebyl pozorován výrazný rozdíl v expresi a to ani v oblastech detekce fibrózní kolagenové tkáně.

GFAP je iniciálním markerem jaterní fibrózy, kdy je jeho exprese patrná zejména v klidových a časně aktivovaných HSCs (Carotti S, Morini S, Corradini SG, et al., 2008). Slabá exprese GFAP byla opět patrná i v hvězdovitých buňkách jater kontrolních zvířat a u DDC a TRC105 skupiny se intenzita ani lokalizace markeru zásadně nezměnila. Malá exprese GFAP v místech fibrotické tkáně poukazuje na přítomnost hvězdovitých buněk. GFAP je markerem pouze klidových či časně aktivovaných HSCs, během fibrózy se jeho exprese snižuje (Cherng S, Young J, Hongbao M, 2008). Zejména u DDC skupiny by tedy jeho exprese měla být snížena, což neodpovídá našim výsledkům, u kterých byla intenzita exprese podobná. Po podání TRC105 nedošlo k žádné změně intenzity exprese obou testovaných markerů, což opět poukazuje na neúčinnost léčiva v patogenezi jaterní fibrózy.

Kolokalizace  $\alpha$ -SMA a GFAP s endoglinem nebyla nalezena v žádném z testovaných řezů. Endoglin je markerem angiogeneze a tedy zmožení endotelových buněk při procesu fibrotizace (Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, et al., 2005; Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, et al., 2011). Jeho exprese byla viditelná v endotelových buňkách sinusoid a centrální vény u kontrolních zvířat. U DDC a TRC105 skupiny byla exprese snížena a je tedy možné předpokládat, že endoglin není klíčovým faktorem v rozvoji fibrózy a proto je těžké posoudit účinek protilátky proti endoglinu TRC105.

# ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla analýza exprese kolagenních vláken a markerů  $\alpha$ -SMA, GFAP a endoglinu v rozvoji jaterní fibrózy po podávání DDC a možný vliv léčiva TRC105. Zvýšená detekce kolagenu u histologického barvení Picro-Sirius Red v porovnání s kontrolní skupinou poukázala na rozvinutou fibrózu po podávání DDC, zatímco u imunohistochemické analýzy  $\alpha$ -SMA, GFAP a endoglinu nedošlo ke změně exprese žádného ze sledovaných markerů. Rovněž nebyl pozorován žádný významný rozdíl v intenzitě exprese markerů  $\alpha$ -SMA a GFAP po podávání léčiva, což poukazuje na jeho neúčinnost na proces jaterní fibrózy. Exprese endoglinu byla po podávání DDC a TRC105 oproti kontrolní skupině snižena z čehož můžeme předpokládat, že endoglin není stěžejním markerem patogeneze tohoto onemocnění.

## SEZNAM ZKRATEK

ZKRATKA	VÝZNAM ZKRATKY	ČESKÝ VÝZNAM
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin	$\alpha$ -smooth muscle aktin
ALP	Alkaline phosphatase	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferase	Alaninaminotransferáza
AST	Aspartataminotransferase	Aspartátaminotransferáza
BMP-9	Bone morphogenic protein-9	Bone morphogenic protein-9
CD105	Endoglin	Endoglin
CYP	Cytochrome	Cytochrom
DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine	3,5-diethoxykarboncyl-1,4-dihydrokolidine
DEN	Diethylnitrosamine	Diethylnitrosamin
DM	Diabetes mellitus	Diabetes mellitus
DMNS	Dimethylnitrosamine	Dimethylnitrosamin
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
Galn	D-galactosamine	D-galaktosamin
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Gliální fibrilární kyselý protein
GGT	$\gamma$ -glutamyl transferase	$\gamma$ -glutamyltransferáza
GIT	Gastrointestinal tract	Gastrointestinální trakt
HRP	Horseradish peroxidase	Křenová peroxidáza
HSCs	Hepatic stellate cells	Jaterní hvězdčovitě buňky
IgG	Imunoglobuline G	Imunoglobulin G
IL	Interleukin	Interleukin
IHC	Imunohistochemistry	Imunohistochemie
MMPs	Matrix metalloproteinases	Matrixové metaloproteinázy
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease	Nealkoholická steatóza jater
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis	Nealkoholická steatohepatitida
PAARy	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$	Peroxisomální proliferativní aktivovaný receptor $\gamma$
PDGF	Platelet-derived growth factor	Růstový faktor odvozený z krevních destiček

<b>PICP</b>	Procollagen I carboxyterminal propeptide	Prokolagen C peptidáza
<b>PIINP</b>	Procollagen II amino peptide	Prokolagen N peptidáza
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
<b>SMAD</b>	Suppressor of mothers against decapentaplegic	Suppressor of mothers against decapentaplegic
<b>TAA</b>	Thioacetamide	Thioacetamid
<b>TGF</b>	Transforming growth factor	Transformující růstový faktor
<b>TIMPs</b>	Tissue inhibitors of metalloproteinases	Inhibitory matrixových metaloproteináz
<b>TRC105</b>	Carotuximab	Carotuximab
<b>UTP</b>	Uridine triphosphate	Uridin trifosfát
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endoteliální růstový faktor

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura jaterního lalůčku (lobulus venae centralis) .....	11
Obrázek 2 – Struktura jaterního acinu .....	12
Obrázek 3 – Progrese inzulinrezistentní adipózní tkáně do NAFLD a NASH.....	16
Obrázek 4 – Změny v architektuře jater asociované s progresí fibrózy .....	18
Obrázek 5 A – Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u kontrolní skupiny .....	38
Obrázek 5 B – Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u DDC skupiny.....	39
Obrázek 5 B – Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u DDC skupiny.....	39
Obrázek 5 D – Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u DDC/TRC105 skupiny .....	40
Obrázek 5 E – Reprezentativní obrázky barvení Sirius Red u DDC/TRC105 skupiny .....	40
Obrázek 6 A – Reprezentativní obrázky detekce $\alpha$ -SMA u kontrolní skupiny .....	41
Obrázek 6 B – Reprezentativní obrázky detekce $\alpha$ -SMA u DDC skupiny.....	42
Obrázek 6 C – Reprezentativní obrázky detekce $\alpha$ -SMA u DDC/TRC105 skupiny .....	42
Obrázek 7 A – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u kontrolní skupiny .....	43
Obrázek 7 B – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u kontrolní skupiny .....	44
Obrázek 7 C – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u DDC skupiny .....	44
Obrázek 7 D – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u DDC skupiny.....	45
Obrázek 7 E – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u DDC/TRC105 skupiny .....	45
Obrázek 7 F – Reprezentativní obrázky detekce GFAP u DDC/TRC105 skupiny.....	46
Obrázek 8 A – Reprezentativní obrázky kolokalizace $\alpha$ -SMA a endoglinu u kontrolní skupiny .....	47
Obrázek 8 B – Reprezentativní obrázky kolokalizace $\alpha$ -SMA a endoglinu u DDC skupiny .....	47
Obrázek 8 C – Reprezentativní obrázky kolokalizace $\alpha$ -SMA a endoglinu u DDC/TRC105 skupiny ..	48
Obrázek 9 A – Reprezentativní obrázky kolokalizace GFAP a endoglinu u kontrolní skupiny.....	49
Obrázek 9 B – Reprezentativní obrázky kolokalizace GFAP a endoglinu u DDC skupiny .....	49
Obrázek 9 C – Reprezentativní obrázky kolokalizace GFAP a endoglinu u DDC/TRC105 skupiny....	50



# SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Protokol pro barvení Picro-Sirius Red .....	32
Tabulka 2 – Protokol pro fluorescenční zobrazení $\alpha$ -SMA .....	33
Tabulka 3 – Protokol pro fluorescenční zobrazení GFAP .....	34
Tabulka 4 – Protokol pro fluorescenční kolokalizaci $\alpha$ -SMA s endoglinem .....	36
Tabulka 5 – Protokol pro fluorescenční kolokalizaci GFAP s endoglinem .....	37

# SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abcam: Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science. [cit. 2022-08-05].  
<https://www.abcam.com/content/immunohistochemistry-the-complete-guide>
2. AFDHAL, Nezam H. a David NUNES. Evaluation of Liver Fibrosis: A Concise Review. *The American Journal of Gastroenterology*. 2004, **99**(6), 1160-1174. ISSN 0002-9270.
3. ALBANIS, Efsevia a Scott L. FRIEDMAN. HEPATIC FIBROSIS. *Clinics in Liver Disease*. 2001, **5**(2), 315-334. ISSN 10893261.
4. ALI, Rafeeq a Kenneth CUSI. New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of Medicine*. 2009, **41**(4), 265-278. ISSN 0785-3890.
5. ARTHUR, Michael J. P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000, **279**(2), G245-G249. ISSN 0193-1857.
6. BARANOVA, Ancha, Priyanka LAL, Aybike BIRERDINC, et al. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology*. 2011, **11**(1). ISSN 1471-230X.
7. BASARANOGLU, Metin a Brent A. NEUSCHWANDER-TETRI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Features and Pathogenesis. *Gastroenterology and hepatology*. 2006, **2**(4), 282-291. ISSN 1440-1746.
8. BASU, Samar. Carbon tetrachlorid-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2003, **189**(1-2), 113-127. ISSN 0300483X.
9. BATALLER, Ramón a David A. BRENNER. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(2), 209-218. ISSN 0021-9738.
10. BEDOSSA, Pierre, Delphine DARGERÉ a Valerie PARADIS. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003, **38**(6), 1449-1457. ISSN 02709139.
11. BEIER, Juliane I. a Craig J. MCCLAIN. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biological Chemistry*. 2010, **391**(11). ISSN 1437-4315.
12. BENYON, R. Christopher. Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 2000, **46**(4), 443-446. ISSN 00175749.
13. BRANDON-WARNER, Elizabeth, Laura W. SCHRUM, C. Max SCHMIDT, et al. Rodent models of alcoholic liver disease: Of mice and men. *Alcohol*. 2012, **46**(8), 715-725. ISSN 07418329.
14. BRUNT, Elizabeth M. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*. 2004, **24**(1), 3–20. ISSN 0272-8087.

15. BURROWS, Francis J., Elaine J. DERBYSHIRE, Pier Luigi TAZZARI, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995, **1**(12), 1623-1634. ISSN 1538-7445.
16. BURTIS, Carl A., Edward R. ASHWOOD a David E. BRUNS. *Teitz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics (5th edition)*. Elsevier, St. Louis, USA. 2012; 528, 574, 578, 581, 1681. ISBN 978-1-4160-6164-9.
17. BUTURA, Angelica. Drug and Alcohol Induced Hepatotoxicity. *Ph. D Thesis Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholom, Sweden*. 2008. ISBN 978-91-7409-055-0.
18. CAROTTI, Simone, Sergio MORINI, Stefano Ginanni CORRADINI, et al. Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transplantation*. 2008, **14**(6), 806-814. ISSN 15276465.
19. CARPINO, Francesco, Eugenio GAUDIO, Giulio MARINOZZI, et al. A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. *Journal of submicroscopis cytology*. 1981, **13**(4), 581-598. ISSN 1122-9497.
20. CORPECHOT, Christophe, Veronique BARBU, Dominique WENDUM, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. 2002, **35**(5), 1010-1021. ISSN 02709139.
21. CRAWFORD, Aleta R., Xi-Zhang LIN a James M. CRAWFORD. The normal adult human liver biopsy: A quantitative reference standard. *Hepatology*. 1998, **28**(2), 323-33. ISSN 0270-9139.
22. CUSI, Kenneth. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*. 2009, **16**(2), 141-149. ISSN 1752-296X.
23. CZAJA, Mark J., Francis R. WEINER, Shizuko TAKAHASHI, et al.  $\Gamma$ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology*. 1989, **10**(5), 795-800. ISSN 02709139.
24. DECKER, Karl. Mechanisms and mediators in hepatic necrosis. *Gastroenterologia Japonica*. 1993, **28**(S4), 20-25. ISSN 0435-1339.
25. FICKERT, Peter, Ulrike STÖGER, Andrea FUCHSBICHLER, et al. A New Xenobiotic-Induced Mouse Model of Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 2007, **171**(2), 525-536. ISSN 00029440.
26. GEORGIEV, Panco, Wolfram JOCHUM, Stefan HEINRICH, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *British Journal of Surgery*. 2008, **95**(5), 646-656. ISSN 0007-1323.

27. GIANNINI, Edoardo, Domenico RISSO, Federica BOTTA, et al. Validity and Clinical Utility of the Aspartate Aminotransferase–Alanine Aminotransferase Ratio in Assessing Disease Severity and Prognosis in Patients With Hepatitis C Virus–Related Chronic Liver Disease. *Archives of Internal Medicine*. 2003, **163**(2). ISSN 0003-9926.
28. GINÈS, Pere, Andrés CÁRDENAS, Vicente ARROYO, et al. Management of Cirrhosis and Ascites. *New England Journal of Medicine*. 2004, **350**(16), 1646-1654. ISSN 0028-4793.
29. GREENFIELD, Victoria, Onpan CHEUNG a Arun J. SANYAL. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008; **24**, 320–327. ISSN 1531-7056.
30. GRESSNER, Olav A., Ralf WEISKIRCHEN a Axel M. GRESSNER. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clinica Chimica Acta*. 2007, **381**(2), 107-113. ISSN 00098981.
31. GRIGORESCU, Mircea. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD*. 2006, **15**, 149–159. ISSN 1842-1121.
32. GUYTON, Arthur C. a John E. HALL. *Textbook of medical physiology (11th edition)*. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2006, 1116. ISBN 0-7216-0240-1.
33. HAYASHI, Hiromitsu a Takao SAKAI. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011, **300**(5), G729-G738. ISSN 0193-1857.
34. HONG, Hao, Yunan YANG, Yin ZHANG, et al. Positron emission tomography imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011, **38**(7), 1335-1343. ISSN 1619-7070.
35. CHERNG, Shen, Jenny YOUNG a Ma HONGBAO. Alpha-smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). *The Journal of American Science*. 2008, **4**(4)7-9. ISSN 1545-1003.
36. ITO, Makoto, Jun SUZUKI, Shigeharu TSUJIOKA, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Research*. 2007, **37**(1), 50-57. ISSN 13866346.
37. JHA, Pooja, Astrid KNOPE, Harald KOEFELER, et al. Role of adipose tissue in methionine–choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2014, **1842**(7), 959-970. ISSN 09254439.
38. JIANG, Zhao, Da-yu YOU, Xiang-chi CHEN, et al. Monitoring of serum markers for fibrosis during CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Journal of Hepatology*. 1992, **16**(3), 282-289. ISSN 01688278.
39. JONES, Albert L. a Elinor SPRING-MILLS. The liver and gallbladder. *Histology* (L. Weiss, ed.), Elsevier Biomedical, New York. 1983, 707–735.

40. KIM, W. Ray, Steven L. FLAMM, Adrian M. DI BISCEGLIE, et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. 2008, **47**(4), 1363-1370. ISSN 02709139.
41. KISSELEVA, Tatiana a David BRENNER. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021, **18**(3), 151-166. ISSN 1759-5045.
42. KISSELEVA, Tatiana, Min CONG, YongHan PAIK, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(24), 9448-9453. ISSN 0027-8424.
43. KWO, Paul Y., Stanley M. COHEN a Joseph K. LIM. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *American Journal of Gastroenterology*. 2017, **112**(1), 18-35. ISSN 0002-9270.
44. LEE, Sangheun. Non-invasive diagnosis of hepatitis B virus-related cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, **20**(2). ISSN 1007-9327.
45. LOW, Teck Yew, Chon Kar LEOW, Manuel SALTO-TELLEZ, et al. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *PROTEOMICS*. 2004, **4**(12), 3960-3974. ISSN 1615-9853.
46. MACSWEEN, Roderick N. M., Alastair D. BURT, Bernard C. PORTMANN, et al. *Pathology of the Liver (4th edition)*. Churchill Livingstone, London. 2002, 1-105. ISBN 0-443-06181.
47. MARING, Janita A., Maria TROJANOWSKA a Peter TEN DIJKE. Role of Endoglin in Fibrosis and Scleroderma. *International Review of Cell and Molecular Biology Volume 297*. Elsevier. 2012, 295-308. ISBN 9780123943088.
48. MARRA, Fabio. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of Hepatology*. 1999, **31**(6), 1106-1119. ISSN 01688278.
49. MEURER, Steffen K., Lidia TIHAA, Birgit LAHME, et al. Identification of Endoglin in Rat Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, **280**(4), 3078-3087. ISSN 00219258.
50. MEURER, Steffen K., Lidia TIHAA, Erawan BORKHAM-KAMPHORST, et al. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling*. 2011, **23**(4), 683-699. ISSN 08986568.
51. MILIĆ, Sandra a Davor ŠTIMAC. Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Steatohepatitis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Presentation and Treatment. *Digestive Diseases*. 2012, **30**(2), 158-162. ISSN 0257-2753.
52. MORITA, Shin-ya, Tadanori TSUDA, Manami HORIKAMI, et al. Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. *Journal of Lipid Research*. 2013, **54**(5), 1221-1230. ISSN 00222275.

53. NALLAGANGULA, Krishna Sumanth, Shashidhar Kurpad NAGARAJ, Lakshmaiah VENKATASWAMY, et al. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Science OA*. 2018, **4**(1). ISSN 2056-5623.
54. NELSON, David R., Regino P. GONZALEZ-PERALTA, Keping QIAN, et al. Transforming growth factor- $\beta$  1 in chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*. 2003, **4**(1), 29-35. ISSN 1352-0504.
55. NIELSEN, Mette J., Konstantin KAZANKOV, Diana J. LEEMING, et al. Markers of Collagen Remodeling Detect Clinically Significant Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *PLOS ONE*. 2015, **10**(9).ISSN 1932-6203.
56. NOLAN-STEVAUX, Olivier, Wendy ZHONG, Stacey CULP, et al. Endoglin Requirement for BMP9 Signaling in Endothelial Cells Reveals New Mechanism of Action for Selective Anti-Endoglin Antibodies. *PLOS ONE*. 2012, **7**(12). ISSN 1932-6203.
57. OZOUGWU, Jevas. Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*. 2017, **4**(8), 13-24. ISSN 2394-5893.
58. PAAUWE, Madelon, Renier C. HEIJKANTS, Charlotte H. OUDT, et al. Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*. 2016, **35**(31), 4069-4079. ISSN 0950-9232.
59. PERSEGHIN, Gianluca, Guido LATTUADA, Francesco DE COBELLI, et al. Increased mediastinal fat and impaired left ventricular energy metabolism in young men with newly found fatty liver. *Hepatology*. 2008, **47**(1), 51-58. ISSN 02709139.
60. PINZANI, Massimo, Krista ROMBOUITS a Stefano COLAGRANDE. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *Journal of Hepatology*. 2005, **42**(1), S22-S36. ISSN 01688278.
61. RAMOS-VARA, Jose A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005, **42**(4), 405-426. ISSN 0300-9858.
62. RIPPE, Richard A. Liver nbsp fibrosis signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in Bioscience*. 2003, **8**(4), d69-77. ISSN 10939946.
63. ROSEN, Lee S., Herbert I. HURWITZ, Michael K. WONG, et al. A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2012, **18**(17), 4820-4829. ISSN 1078-0432.
64. SAITOU, Yukiko. Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2005, **11**(4). ISSN 1007-9327.
65. SHARMA, Bashar, Savio JOHN. Hepatic Cirrhosis. *StatPearls*. StatPearls Publishing Treasure Island, FL, USA, 2021.

66. SHERLOCK, Sheila a James DOOLEY. *Nemoci jater a žlučových cest*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2004. ISBN 80-86703-00-2.
67. Thermo-Fisher-Scientific. Overview of Immunohistochemistry (IHC). In, Protein Biology Resource Library. [cit.2022-04-24].  
[https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein\\_methods/overview-immunohistochemistry.html](https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein_methods/overview-immunohistochemistry.html)
68. TREFTS, Elijah, Maureen GANNON a David H. WASSERMAN. The liver. *Current Biology*. 2017, **27**(21), R1147-R1151. ISSN 09609822.
69. VERNA, Lynne. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & Therapeutics*. 1996, **71**(1-2), 57-81. ISSN 01637258.
70. WALSH, Kevin Michael, Alexander FLETCHER, Roderick N.M. MACSWEEN, et al. Basement membrane peptides as markers of liver disease in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2000, **32**(2), 325-330. ISSN 01688278.
71. WEBER, Lutz W.D., Meinrad BOLL a Andreas STAMPFL. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*. 2008, **33**(2), 105-136. ISSN 1040-8444.
72. WIKSTRÖM, Pernilla, Ingela Franck LISSBRANT, Pär STATTIN, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *The Prostate*. 2002, **51**(4), 268-275. ISSN 02704137.
73. WU, Jian a Pamela A. NORTON. Animal Models of Liver Fibrosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009, **31**(12), 1137-1143. ISSN 0036-5521.
74. ZHOU, Jiyuan, Yongqiong DENG, Linlin YAN, et al. Serum platelet-derived growth factor BB levels: a potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016, **49**, 94-99. ISSN 12019712.
75. ZIMMERMANN, Thomas, MÜLLER A., Georg MACHNIK, et al. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. *Zeitschrift für Versuchstierkunde*. 1987, **30**(5-6), 165-180. ISSN 0044-3697.