

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



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Imunohistochemická analýza vlivu M1043 na expresi endoglinu u  
myšího modelu NASH

**ADÉLA KUBÍČKOVÁ**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

## Poděkování

Ráda bych tímto způsobem poděkovala RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady, které mi při vypracování mé bakalářské práce poskytla.

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

V Hradci Králové 2024

---

Podpis

# Obsah

1. Abstrakt .....	6
2. Abstract.....	7
3. Úvod .....	8
4. Teoretická část.....	9
4.1.Morfologie a histologie jater .....	9
4.1.1 Anatomie jater .....	9
4.1.2 Krevní zásobení jater .....	9
4.1.3 Žlučové cesty .....	10
4.1.4 Morfologická stavba jater .....	10
4.1.5 Funkce jater .....	13
4.2. NAFLD a NASH .....	14
4.2.2 Etiopatogeneze NASH .....	15
4.2.3 Význam endotelových buněk při jaterních onemocněních.....	17
4.2.4 Markery endotelové dysfunkce .....	19
4.2.4.1 VCAM-1 .....	21
4.2.4.2 Endoglin .....	25
4.3. Zvířecí modely jaterního poškození typu NAFLD .....	27
4.3.1 NAFLD modely s genetickými změnami .....	27
4.3.2 NAFLD modely indukované dietou.....	28
4.3.2.1 Myši s dietou s nedostatkem cholinu (CD) .....	28
4.3.7 Ostatní zvířecí modely .....	30

<b>4.4 Protilátka M1043.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 Imunohistochemie .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Cíle práce .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Experimentální část .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 Experimentální zvířata .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2 Princip metody .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Výsledky.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Diskuse.....</b>	<b>44</b>
<b>9. Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>47</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>51</b>
<b>Zdroje obrázků .....</b>	<b>52</b>
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>54</b>

# 1. Abstrakt

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

**Katedra:** Katedra biologických a lékařských věd

**Kandidát:** Adéla Kubičková

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

**Název práce:** Imunohistochemická analýza vlivu M1043 na expresi endoglinu u myšího modelu NASH

Během nealkoholové steatohepatitidy (NASH) dochází k morfologickým a funkčním změnám endotelových buněk jaterních sinusoid a nastává endotelová dysfunkce. Bylo prokázáno, že při NASH se zvyšuje exprese adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1) a endoglinu. Vlivem endoglinu je zvýšená aktivace jaterních hvězdicových buněk, které prohlubují proces fibrotizace.

Cílem této bakalářské práce bylo detekovat expresi endoglinu a adhezní molekuly VCAM-1 u myšího modelu NASH po 8týdenním podávání CDAA diety (cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná dieta). Myši byly rozděleny do 2 skupin (n=8). Kontrolní skupině se 4 týdny podávala potkaní protilátka IgG (skupina CDAA+rat IgG) a skupině CDAA+M1043 se aplikovala anti-endoglinová protilátka M1043. Analýza exprese vybraných proteinů byla provedena imunohistochemickou metodou pomocí avidin-biotin metody.

Výsledky této práce ukazují, že nedošlo k snížení exprese VCAM-1 ani endoglinu po aplikaci anti-endoglinové protilátky M1043 oproti kontrolní IgG skupině. Exprese VCAM-1 byla pozorována v endotelových buňkách jaterních sinusoid. Exprese endoglinu byla pozorována v endotelových buňkách a v jaterních hvězdicových buňkách. Závěrem lze shrnout, že podávání M1043 nemá vliv na rozvoj NASH.

**Klíčová slova:** nealkoholová jaterní steatohepatitida (NASH), endotelová dysfunkce, endoglin, VCAM-1, M1043, imunohistochemie

## 2. Abstract

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

**Department:** Department of Biological and Medical Sciences

**Candidate:** Adéla Kubičková

**Supervisor of Bachelor thesis:** RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

**Title of Bachelor thesis:** Immunohistochemical analysis of the effect of M1043 on endoglin expression in a mouse model of NASH

The morphological and functional changes of the endothelial cells of the hepatic sinusoids and endothelial dysfunction occur during nonalcoholic steatohepatitis (NASH). It has been shown that the expression of adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1) and endoglin increase in NASH. Endoglin affects the activation of hepatic stellate cells, which attenuate the process of fibrotization.

The aim of this bachelor thesis was to detect the expression of endoglin and the adhesion molecule VCAM-1 in a mouse model of NASH after 8 weeks of CDAA diet (choline-deficient and L-amino acid-defined diet). Mice were divided into 2 groups (n=8). The control group was injected with rat IgG antibody (CDAA+rat IgG group) for 4 weeks and the CDAA+M1043 group had anti-endoglin antibody M1043. The analysis of selected proteins expression was performed by immunohistochemical method using avidin-biotin method.

The results of this thesis show that there was not any reduction in the expression of VCAM-1 or endoglin after M1043 treatment compared to the control group. VCAM-1 expression was observed in the endothelial cells of the liver sinusoids. The endoglin expression was observed in endothelial cells and in hepatic stellate cells. In conclusion, M1043 has no effect on the progression of NASH.

**Key words:** nonalcoholic steatohepatitis (NASH), endothelial dysfunction, endoglin, VCAM-1, M1043, immunohistochemistry

### 3. Úvod

Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD) postihuje velkou část populace vyspělých zemí. Více závažná forma NAFLD je nealkoholová steatohepatitida (NASH), při které dochází k ztvárnění jater, což se může rozvinout až v hepatocelulární karcinom. K rozvoji NASH přispívá strava bohatá na tuky. Nejčastěji se NASH projevuje u lidí s obezitou, s cukrovkou druhého typu a inzulinovou rezistencí, což se souhrnně nazývá jako metabolický syndrom. (Hůlek a Urbánek, 2018; Martínek a Trunečka, 2021)

Endotelové buňky se nacházejí v sinusoidách jaterní tkáně a ve zdravých játrech produkují protifibrotické a protizánětlivé látky. Při NASH dochází k funkčním i morfologickým změnám endotelových buněk prostřednictvím procesu kapilarizace. Nastává takzvaná endotelová dysfunkce, při které je zvýšená exprese adhezních molekul, mezi které patří VCAM-1. K rozvoji fibrózy rovněž přispívá endoglin, byla popsána jeho zvýšená exprese jak na myším modelu NASH, tak i u pacientů s NAFLD. Tyto zvýšené hladiny endoglinu jsou spojovány s aktivací jaterních hvězdicových buněk. Hvězdicové buňky při aktivaci produkují velké množství kolagenu, který tvoří základ pro fibrotickou tkáň. (Alsamman et al., 2018; Eissazadeh et al., 2024; Furuta et al., 2023; Garcia-Monzón et al., 2000; Ibrahim, 2021)

Protilátka M1043 se váže na myší endoglin, proto předpokládáme, že by mohla snižovat rozvoj fibrózy a zánětu. Vliv této anti-endoglinové protilátky na jaterní tkáň byl v naší práci studován pomocí imunohistochemické metody na jaterních řezech z myšího modelu s indukovanou NASH. (Schoonderwoerd et al., 2020b)



## 4. Teoretická část

### 4.1. Morfologie a histologie jater

Největším orgánem z parenchymu v těle jsou játra. Mohou vážit až 3 % tělesné hmotnosti, což představuje u dospělého muže 1,5–1,8 kg a u ženy 1,2–1,5 kg. S věkem toto procentuální zastoupení klesá, a naopak u novorozenců zaujímají játra až 5 % tělesné hmotnosti. (Hůlek a Urbánek, 2018)

#### 4.1.1 Anatomie jater

Horní plocha (*facies diaphragmatica*) jater nasedá na pravou klenbu bránice, a proto se při dýchání jejich poloha mění o 3–4 cm. Jedná se o orgán tvaru jehlanu, jehož vrchol je namířen k levé břišní stěně a jeho podstava k pravé břišní stěně. Zadní plocha jater se dotýká zadní části bránice, se kterou je srostlá společně se zadní stěnou břišní v oblasti bez pobřišnice, která se nazývá *pars affixa* nebo též *area nuda*. V této oblasti se nachází i dolní dutá žíla. Spodní plocha (*facies visceralis*) jater nasedá na orgány, které jsou umístěny v dutině břišní. (Čihák, 2002; Hůlek a Urbánek, 2018)

Játra jsou měkký orgán, a proto je jejich tvar ovlivněn okolními orgány a vznikají tak otisky (*impressia*) na spodní ploše. Játra rozdělujeme na pravý a levý lalok. Předěl mezi laloky tvoří srpovitý vaz (*ligamentum falciforme*), což je pruh tkáně, který není pokrýván pobřišnicí (*peritoneum*). Pobřišnice je na většině povrchu připojena na *tunicu fibrosu* přes subserózní vazivo. (Čihák, 2002; Hůlek a Urbánek, 2018)

#### 4.1.2 Krevní zásobení jater

Céva, která sbírá žilní krev z nepárových orgánů trávicího traktu, žlučníku, pankreatu, sleziny a odvádí ji do jater, se nazývá vrátnicová žíla (*vena portae*). Kmen vrátnicové žíly vstupuje do jater v oblasti *ligamenta hepatoduodenale* společně s jaterní tepnou. Jedná se o žílu širokou 15 mm. (Hůlek a Urbánek, 2018)

Jaterní tepna (*arteria hepatica communis*) zásobí játra nutritivní složkou bohatou na kyslík a vychází z *truncus coeliacus* jako jeho pravá větev. Jaterní tepna má za úkol zajistit výživu žlučovým cestám, vazivu a stěnám velkých žil. Jaterní tepna a žíla se spolu větví a vznikají z nich interlobulární žíly a tepny. Ty se větví na cirkumlobulární cévy, které vyživují plochy třech lalůček okolo portobiliárního prostoru. Jejich větve procházejí

mezi trámci jaterních buněk jako sinusoidy, odkud je pak krev vedena do *vena centralis*. (Hůlek a Urbánek, 2018)

### 4.1.3 Žlučové cesty

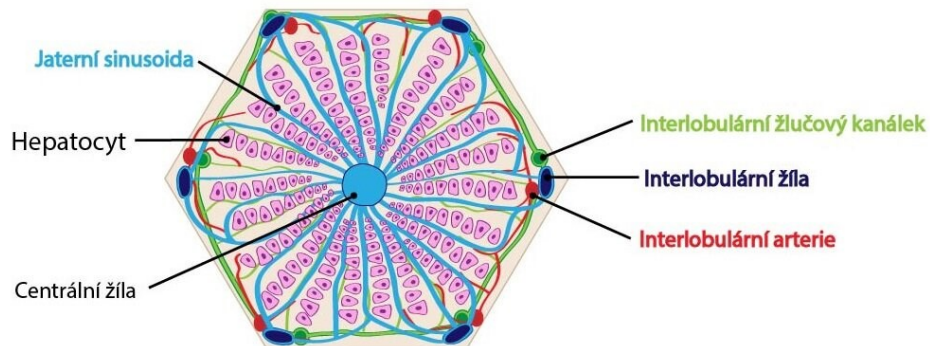
Hepatocyty produkují žluč, která se skládá ze žlučových kyselin a jejich solí, iontů, fosfolipidů, mastných kyselin, bilirubinu a cholesterolu. Uvnitř jaterního lalůčku mezi každými dvěma hepatocyty začínají žlučové kanálky, které jsou bez epitelové výstelky. Na žlučové kanálky navazují intralobulární žlučovody, které procházejí mezi dvěma trámci jaterních buněk. Na periférii lalůčku se již ve stěně žlučových cest nachází kubický epitel utvořený z cholangiocyty, které představují stěny Heringových kanálků (*ductuli biliferi*). Regenerační schopnost cholangiocyty a hepatocyty zajišťují oválné kmenové buňky, které jsou umístěny v okolí portobiliárních prostorů mezi cholangiocyty. Žluč prochází přes Heringův kanálek a vstupuje do portobiliárního prostoru, kde se nachází interlobulární žlučovod, na který se napojuje. Větve interlobulárního žlučovodu se spojují do lobulárních vývodů, které se slučují do společného jaterního vývodu, jehož délka činí 2–4 cm. K jaternímu vývodu se připojuje vývod žlučníku v oblasti *ligamentum hepatoduodenale*. Společně se žlučovým vývodem ústí na velké papile dvanáctníku. Sliznice žlučových cest je krytá cylindrickým epitelem, který produkuje hlen, a tím dokáže ovlivňovat složení žluči. (Čihák, 2002; Hůlek a Urbánek, 2018; Mescher, 2018)

### 4.1.4 Morfologická stavba jater

Buněčnou složku jater představují zejména hepatocyty. Jedná se o epiteliální buňky velké 20–30 μm, které zaujímají velkou část objemu jater. S rostoucím věkem přibývá množství dvoujaderných hepatocyty a hepatocyty s polyploidii chromozomů. Drsné endoplazmatické retikulum hepatocyty produkuje proteiny krevní plazmy a způsobuje, že cytoplazma vykazuje bazofilii, která je více zřetelná v portobiliárních prostorech. Biotransformační a detoxikační enzymy jsou uschovávány v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocyty. Metabolity transformace jsou sekretovány do žluče nebo jsou odnášeny krví do ledvin. (Čihák, 2002; Mescher, 2018)

Dvě řady hepatocyty se spojují do trámců jaterních buněk, které obklopují centrální věnu a tvoří tak šestihranný 2 mm dlouhý útvar zvaný lalůček centrální žíly (obrázek 1). Trámce hepatocyty jsou obkloповány podpurným stroma z retikulárních vláken. Ve středu lalůčku se nachází centrální žíla, do které ústí jaterní sinusoidy. V hranách lalůčku jsou portobiliární prostory, kterými prochází interlobulární žíly, interlobulární tepny a interlobulární žlučovody. Společně se tyto útvary nazývají jaterní triáda (*trias hepatica*,

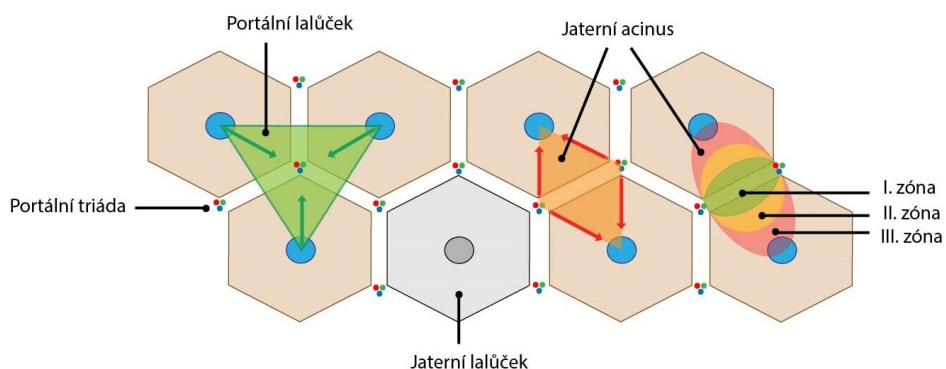
*Glissonova trias*). Okolo každého lalůčku je tři až šest portobiliárních prostorů, které jsou vystlány vazivem. Kromě jaterní triády se v portobiliárním prostoru nachází nervová vlákna společně s lymfatickými cévami. (Čihák, 2002; Mescher, 2018; Trefts et al., 2017)



Obrázek 1: Struktura jaterního lalůčku

Převzané z: Fontana et al., 2014

Za funkční jednotku jater se považuje portální lalůček (obrázek 2), který je definován zásobením jednou interlobulární žílou a jejími cirkumlobulárními žíly. Portální lalůček připomíná tvarem trojúhelník, jehož centrem prochází interlobulární žíla a v jehož vrcholech se nachází centrální žíly. Žluč v jednom portálním lalůčku je odváděna do jednoho interlobulárního žlučovodu a protéká proti směru toku krve. (Čihák, 2002; Mescher, 2018)



Obrázek 2: Rozdělení jaterního parenchymu

Převzané z: Fontana et al., 2014

Primární jaterní acinus je jednotka, která je zásobena jednou cirkumlobulární žílou a tepnou. Má tvar dvou spojených trojúhelníků, které jsou k sobě přiloženy v okolí cirkumlobulární žíly. Podle rozdílného průtoku krve sinusoidami a stupně patologických

proměn rozeznáváme 3 zóny primárního jaterního acinu. Hepatocyty zóny 1 se nacházejí v blízkosti tepny, a tudíž dostávají nejvíce kyslíku a živin. Okolo centrální žíly jsou umístěny hepatocyty zóny 3. Jsou nejdále od tepny, a proto dostávají nejméně kyslíku a živin, což ovlivňuje jejich funkce. V této zóně se nejvíce ukládají tuky při patologii. Hepatocyty zóny 2 jsou funkčně na rozhraní zbylých zón. (Čihák, 2002; Mescher, 2018)

Hvězdicové Itovy buňky mají nepravidelný tvar a nachází se v Disseho prostoru. Mohou být v aktivní či neaktivní formě. Jejich úlohou je skladování vitamínu A. Tento vitamin se objevuje v cytoplazmatických tukových kapénkách buněk a ztrácí se při aktivaci hvězdicových buněk. K aktivaci hvězdicových buněk dochází po narušení jater, což vede k zjizvení tkáně za současného vyplavení kolagenu z hvězdicových buněk. Následkem aktivace buněk může být cirhóza jater, neboť se mění na myofibroblasty. Produkci cytokinů ovlivňují funkci Kupfferových buněk. (Čihák, 2002; Mescher, 2018; Trefts et al., 2017)

Úlohu makrofágů v játrech zajišťují Kupfferovy buňky. Tyto buňky se nacházejí mezi endotelovými buňkami sinusoid a fagocytují zbytky buněk, mikroorganismy a staré erythrocyty, ze kterých se uvolňuje hemoglobin. Kupfferovy buňky rozkládají hemoglobin na hem a globin. Z hemu se poté uvolní železo, které je ve formě ferritinových nebo hemosiderinových komplexů skladováno v Kupfferových buňkách konkrétně v elektrondenzních inkluzích. (Mescher, 2018)

Jaterní sinusoidy jsou ohraničeny hepatocyty a zajišťují kapilární síť odvodných a přívodných cév jater. Arteriální krev vstupuje do sinusoid převážně v oblasti první a druhé zóny jaterního lalůčku. Sinusoidy ústí do centrálních žil, které se spojují do sublobulárních žil a ty se slučují v jaterní žíly, jenž vstupují do dolní duté žíly. (Hůlek a Urbánek, 2018; Trefts et al., 2017)

Endotel sinusoid je tvořen fenestrovanými pláty, které se skládají z volně propojených překrývajících se buněk. Bazální lamina sinusoid je také nesouvislá. Pláty mají v sobě póry o velikosti 50–180 nm, díky nimž dochází k výměně malých látek mezi plazmou a játry, například bílkovin. Průsvit sinusoid může měřit 7–15  $\mu\text{m}$ . Při potřebě se však může zvětšit až na 180  $\mu\text{m}$ . Změna průsvitu je omezena velikostí Disseho prostoru, což je prostor, který se nachází mezi endotelem sinusoidy a trámci hepatocytů, které na sobě mají mikrokly. (Hůlek a Urbánek, 2018; Trefts et al., 2017)

### 4.1.5 Funkce jater

Hepatocyty mají různé funkce v závislosti na tom, kde se nacházejí. V hepatocytech zóny 1 spíše probíhá glykogenolýza, katabolismus aminokyselin, syntéza cholesterolu a močoviny. Naopak hepatocyty v zóně 3 se specializují na děje, jako je glykolýza, ketogeneze, syntéza glutaminu a glykogenu z glukózy atd. (Wilhelm a Hegyi, 2007)

Látky, které jsou vstřebány ve střevě, se do jater dostávají přes portální oběh. Jejich metabolismus probíhá aerobně, k čemuž je potřeba velké množství energie a proto 18 % objemu jaterní buňky zaujímají mitochondrie. V játrech se odehrává nejvíce metabolických dějů k získání energie, z tohoto důvodu musí být schopny skladovat velké množství glukózy konkrétně ve formě glykogenu. Koncentrace glykogenu v buňce je regulována hormonálně. Působením glukagonu se aktivuje glukoneogeneze, glykogeneze a oxidace tuků. (Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

Inzulin je hormon, který má protichůdné účinky ke glukagonu. Při aktivaci inzulinu dochází k inhibici glukoneogeneze společně se syntézou glykogenu a tuků. Po jídle se zvyšuje ukládání glykogenu a proces glykolýzy, přičemž se snižuje působení glukagonu, a naopak se aktivuje inzulin. Při půstu dochází k opačným dějům, během kterých se rozkládá glykogen a vytváří se glukóza. Dalšími sacharidy, které játra produkují jsou galaktóza, fruktóza a glukóza. (Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

V játrech probíhá tvorba až 90 % bílkovin a jejich rozklad na aminokyseliny. Aminokyseliny se dále štěpí na uhlíkový řetězec a toxický amoniak, ze kterého vzniká kyselina močová. Uhlíkové řetězce z některých aminokyselin mohou sloužit jako substráty pro glukoneogenezi, k čemuž dochází ve svalech a střevech. Kvůli tvorbě albuminu regulují játra i objem krve, neboť albumin je hlavní plazmatický transportér. Albumin přenáší tuky a hormony. Jsou schopna poskytnout až 50 % svého krevního objemu krevnímu oběhu, což je uzpůsobeno díky kontrakci jaterních cév. (Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

Bílkoviny tvořené v játrech mohou být různé hormony, růstové faktory a signální molekuly. Konkrétně se jedná o angiotenzinogen, ceruloplazmin, některé faktory krevního srážení, erythropoetin, apolipoproteiny, antitrombin III a mnoho dalších. Játra inaktivují a uvolňují steroidy jako například estrogen a glukokortikoidy. (Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

Játra produkují každý den až 750 ml žluči, která společně s produkty po trávení tuků vytváří ve vodě emulgované komplexy, díky nimž mohou být tuky a vitaminy rozpustné

v tucích lépe vstřebány. Žluč, která vznikla v hepatocytech je pomocí žlučových cest vedena do žlučníku, kde se uskládňuje a zahušťuje. (Čihák, 2002; Wilhelm a Hegyi, 2007)

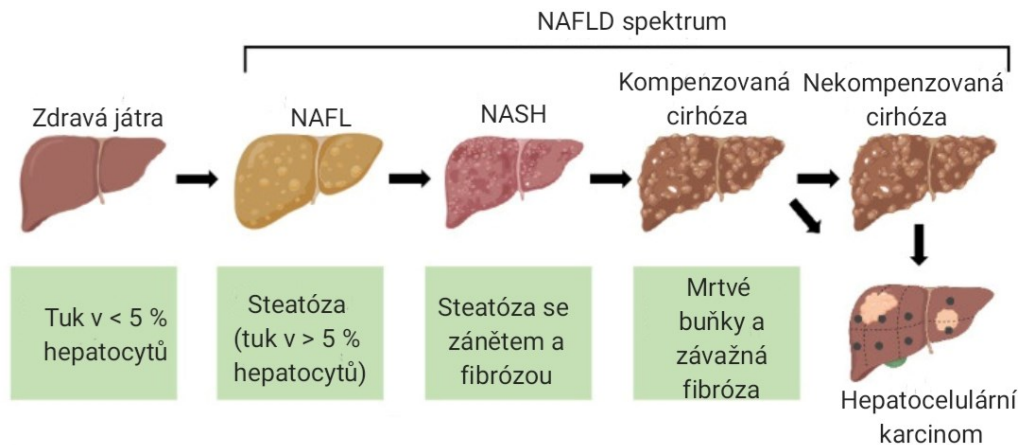
Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), s nízkou hustotou (LDL) a s vysokou hustotou (HDL) jsou také produkovány a odbourávány játry. Lipoproteinovou lipázou se v játrech dostávají z chylomikronů mastné kyseliny, které se do hepatocytů dostávají pomocí CD36 transportérů. Beta oxidací mastných kyselin vznikají v játrech ketolátky, což jsou energicky bohaté látky, které se tvoří při dlouhodobém lačnění. V játrech se zpracovává strávený cholesterol nebo si jej játra sama vytvoří. Cholesterol má v těle několik funkcí. Například je součástí membrán buněk. (Čihák, 2002; Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

Lipofilní sloučeniny se musí biotransformačními reakcemi převést na sloučeniny, které lze lépe vyloučit. Aby došlo k této přeměně, je potřeba mít enzymy monooxygenázy, které jsou uskladněné v endoplazmatickém retikulu. Monooxygenázy se uplatňují při první fázi biotransformace, kdy dochází k deaminaci, tvorbě žlučových kyselin a oxidativnímu odštěpení vazeb cholesterolu. V druhé fázi probíhají děje jako oxidace, redukce a konjugace za vzniku hydrofilních metabolitů. Metabolity jsou poté vyloučeny močí nebo přecházejí do žluči. (Čihák, 2002; Trefts et al., 2017; Wilhelm a Hegyi, 2007)

Při stravě bohaté na tuky si játra ukládají přebytečný tuk ve formě tukových zásob. Játra mají skladovací funkci, což znamená, že se v nich uchovávají látky jako vitaminy, měď a železo. (Čihák, 2002; Trefts et al., 2017)

## 4.2. NAFLD a NASH

Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD) je popisována jako abnormální ukládání tuků v játrech, což je spojováno s inzulínovou rezistencí. V histologickém nálezu se NAFLD prokáže steatózou u více než 5 % hepatocytů anebo zvýšeným obsahem tuku v tkáni nad 5,6 % objemu jater. NAFLD se může projevit nealkoholovou prostou steatózou (NAFL) nebo nealkoholovou steatohepatitidou (NASH), která zahrnuje steatohepatitidu, fibrózu, jenž se může rozvinout v jaterní cirhózu, a hepatocelulární karcinom (obrázek 3). Nepoměr mezi příjmem a výdejem energie vede ke steatóze, kvůli které dochází k nadměrnému ukládání triacylglycerolů bohatých na energii do tukové tkáně a do jater. Konkrétně k vývoji NAFLD vede větší množství fruktózy, transmastných kyselin atd. v potravě. (Hůlek a Urbánek, 2018; Martínek a Trunečka, 2021)



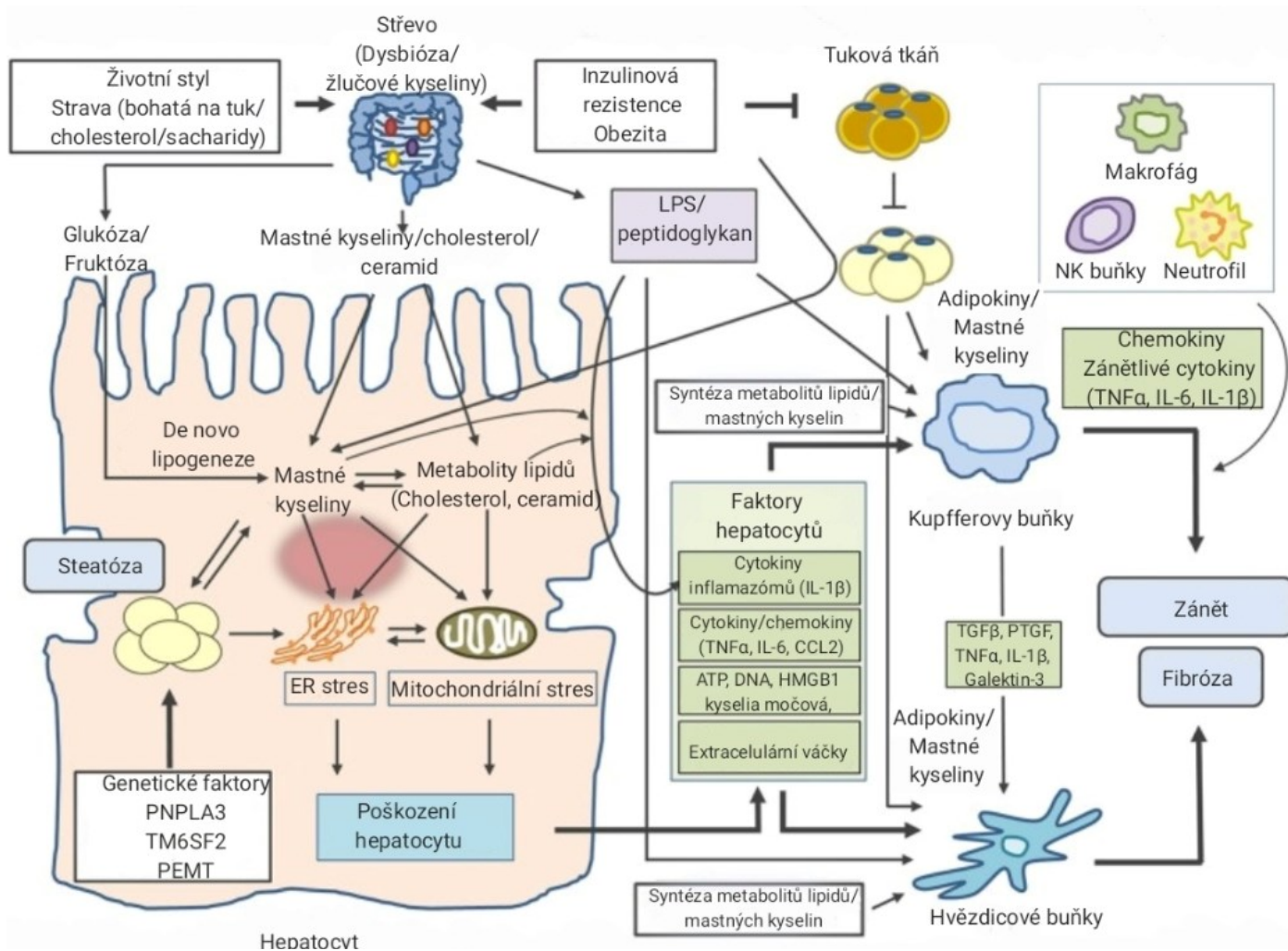
Obrázek 3: NAFLD spektrum – upraveno

Převzané z: Guo et al., 2022a

Výskyt metabolických rizikových faktorů podporuje pravděpodobnost vzniku NAFLD. NAFLD se rozvíjí většinou bez příznaků. Nejčastěji se na toto onemocnění přichází při kontrole diabetických a obézních pacientů. NAFLD je kromě obezity a diabetu mellitu 2. typu často spojována s dyslipidemií, cystickými ovarii nebo spánkovou apnoí. V krvi se NAFLD prokazuje nadměrnou aktivitou alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Biochemickými ani zobrazovacími metodami nelze odlišit NASH od NAFL. Jediným způsobem, jak rozeznat NAFL a NASH je pomocí zhodnocení stupně fibrózy jaterní biopsií. Pro diagnózu NAFLD je důležitý nález steatózy společně s balónovou degenerací hepatocytů a lobulárním zánětem. (Hůlek a Urbánek, 2018; Martínek a Trunečka, 2021)

#### 4.2.2 Etiopatogeneze NASH

Výskyt obezity a metabolického syndromu společně s inzulínovou rezistencí významně souvisí s rozvojem nealkoholové steatózy a steatohepatitidy (obrázek 4). Dále má na vznik a rozvoj NAFLD vliv snížená fyzická aktivita, vyšší příjem kalorií a genetické predispozice (např. mutace v genu pro PNPLA3 – palatinu podobná fosfolipázová doména 3). U pacientů s touto mutací byl současně zvýšen výskyt hepatocelulárního karcinomu. (Hůlek a Urbánek, 2018)



Obrázek 4: Schéma patogeneze NASH – upraveno

Převzané z: Kim a Lee, 2018

Vlivem inzulinové rezistence dochází k poškození hepatocytů mechanismy oxidačního stresu, přičemž játra se steatózou jsou více citlivá vůči oxidativnímu poškození. Ke vzniku inzulinové rezistence vede nadměrné množství prozánětlivých adipokynů, které jsou produkovány tukovou tkání. Inzulinová rezistence přímo vede k lipolýze v okolních tkáních, ke zvýšené glukoneogenezi, ke snížení beta-oxidace, jenž vede ke stimulaci syntézy triacylglycerolů a ke sníženému využívání volných mastných kyselin. Volné mastné kyseliny se ukládají v játrech. Při nadměrném množství inzulinu v těle dochází k aktivaci proteinu vázajícího se na sterol-regulační element (SREBP), který svým působením zvyšuje lipogenezi. Při steatóze je narušena tvorba apolipoproteinu C3, která vede k poškození syntézy VLDL, a tudíž i k snížení vylučování lipidů z jaterních buněk. (Hůlek a Urbánek, 2018)

V hepatocytech dochází k esterifikaci mastných kyselin glycerol-3-fosfátem za vzniku monoacylglycerolů, diacylglycerolů a triacylglycerolů, které se v nich poté uskladňují.



Přeměna triacylglycerolu na diacylglycerol je zprostředkována pomocí tukové triglyceridové lipázy. Diacylglycerol je aktivátorem protein kinázy C $\epsilon$ , která inhibuje inzulin receptorovou kinázu prostřednictvím své membránové translokace, a tím snižuje působení inzulinu v inzulinové signální kaskádě. (Byrne a Targher, 2015)

Při zvýšení koncentrace mastných kyselin nastává nadměrná exprese proapoptických receptorů Fas a ligandového receptoru vyvolávajícího apoptózu spojenou s tumor nekrotizujícím faktorem 5 (TRAIL 5), což vede k vyvolání apoptózy a zhoršení fibrózy a zánětu. Volné mastné kyseliny ovlivňují stabilizaci lysozymů, což předchází aktivaci transkripčního nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B zvyšuje syntézu tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), způsobující poruchu funkce mitochondrií, a interleukinů 1 a 6 (IL-1 a IL-6), které vedou k nekróze hepatocytů a dalšímu zhoršení inzulinové rezistence. NF- $\kappa$ B také přispívá ke zvýšené syntéze cyklooxygenázy 2 (COX-2), kvůli které se produkují další prozánětlivé mediátory. Reakce mitochondrií na vyšší množství reaktivních forem kyslíku (ROS), což je způsobeno nadbytkem mastných kyselin, vede k tvorbě odpřahujícího proteinu 2. Tento protein snižuje množství ROS a paradoxně také tvorbu adenosintrifosfátu (ATP), přičemž může dojít ke smrti hepatocytů. Oxidační stres v hepatocytech je stupňován aktivitou cytochromu CYP2E1, která se zvyšuje úměrně s množstvím mastných kyselin a ketolátek, což dále vede k prohlubování inzulinové rezistence. Následkem toxicity mastných kyselin se syntetizují více triacylglyceroly. K buněčné smrti vede též zvýšené množství volného cholesterolu v buňce. (Hůlek a Urbánek, 2018)

#### 4.2.3 Význam endotelových buněk při jaterních onemocněních

Endotelové buňky vystylají sinusoidy v jaterním parenchymu a zajišťují homeostázu jater. Jejich funkcí je produkovat protifibrotické a protizánětlivé látky prostřednictvím, kterých zabraňují aktivaci hvězdicových a Kupfferových buněk. Za aktivaci prozánětlivých cytokinů jsou odpovědné proteinové složky inflamazómy. Metabolická regulace endotelových buněk je zprostředkována parakrinní signalizací z Kupfferových buněk, hepatocytů, hvězdicových buněk a buněk imunitního systému. (DeLeve a Maretta-Mira, 2017; Furuta et al., 2023; Ibrahim, 2021)

Oproti ostatním buňkám jsou endotelové buňky chudé na mitochondrie a energii získávají přes glykolýzu, přičemž ostatní buňky jsou spíše závislé na oxidativní fosforylaci v mitochondriích nebo na tvorbě ATP. U těchto buněk je zvýšená schopnost přijímat makromolekuly a nanočástice endocytózou zprostředkovanou klatrinem. Tím se

liší od Kupfferových buněk, které látky fagocytují. (DeLeve a Maretti-Mira, 2017; Furuta et al., 2023)

Endotelové buňky přijímají LDL přes receptor stabilin-1. Větší hladiny LDL mohou zvyšovat pravděpodobnost rozvinutí metabolického syndromu a nealkoholové steatohepatitidy. Metabolismus lipopolysacharidů probíhá převážně v játrech. Až z 75 % mohou za tento proces endotelové buňky, které jsou schopné odbourávat komplex navázaných lipopolysacharidů na HDL. Sérové hladiny lipopolysacharidů mohou být zvýšené při NASH, jaterní cirhóze a alkoholové hepatitidě. Endotelové a méně i Kupfferovy buňky mají schopnost pohlcovat virové částice a zajišťují tak obranu proti některým virům. (DeLeve a Maretti-Mira, 2017)

Následkem NAFLD se endotelové buňky mění morfologicky a funkčně společně se zvýšenou expresí adhezních molekul. Při prvotních fázích NASH dochází k takzvané kapilarizaci endotelových buněk, což znamená, že se zmenší počet a diametr fenestrací a vzniká souvislá bazální membrána. Následkem steatózy probíhá v hepatocytech lipogeneze, neboť při kapilarizaci neprochází zbytky chylomikronů přes sinusoidy do hepatocytů a buňka si musí nahradit ztráty lipidů. S narůstajícím věkem se také více projevuje proces kapilarizace. (DeLeve a Maretti-Mira, 2017; Furuta et al., 2023; Hammoutene a Rautou, 2019; Ibrahim, 2021)

Vlivem balónových a zvětšených hepatocytů při NASH jsou sinusoidy utlačovány, čímž vzniká endotelová dysfunkce. Dochází k poruše regulace vazodilatace kapilár v závislosti na působcích z prostředí, k zvýšené tvorbě endotelinu-1 a tromboxan syntázy. Také nastává inhibice endoteliální syntázy NO (eNOS), což vede ke snížení produkce NO, který napomáhá rozšíření cév. (Hammoutene a Rautou, 2019; Ibrahim, 2021)

Podle *in vitro* experimentů snižuje oxidovaný LDL funkci endoteliální syntázy NO přes vazbu na receptor lipoxygenázy 1 (LOX1). Množství NO je krom toho sníženo kvůli palmitové kyselině, která reguluje aktivitu NOX1 enzymu. Při snížení aktivity eNOS se zvyšuje aktivita indukované formy NO syntázy (iNOS). Tento enzym zvyšuje oxidativní stres, což vede k prohloubení endotelové dysfunkce. Indukovaná syntáza NO spotřebovává NO, ze kterého vytváří peroxynitrit. NO také inhibuje *de novo* lipogenezi. To je zapříčiněno tím, že NO reguluje syntézu citrátu, podporuje beta oxidaci mastných kyselin a snižuje aktivitu acetyl koenzym A karboxylázy a glycerol-3-fosfát acyltransferázy. Snížené množství NO způsobuje aktivaci Kupfferových buněk. Na endotelovou dysfunkci má vliv i inzulinová rezistence, protože inzulin má vazokonstrikční

účinky, které jsou při steatóze narušeny. K endotelové dysfunkci dochází v brzkých stádiích rozvoje NAFLD, neboť bylo zjištěno, že je snižená schopnost vazokonstrikce i u steatotických jater bez zánětu a fibrózy. (DeLeve a Maretti-Mira, 2017; Furuta et al., 2023; Hammoutene a Rautou, 2019; Ibrahim, 2021)

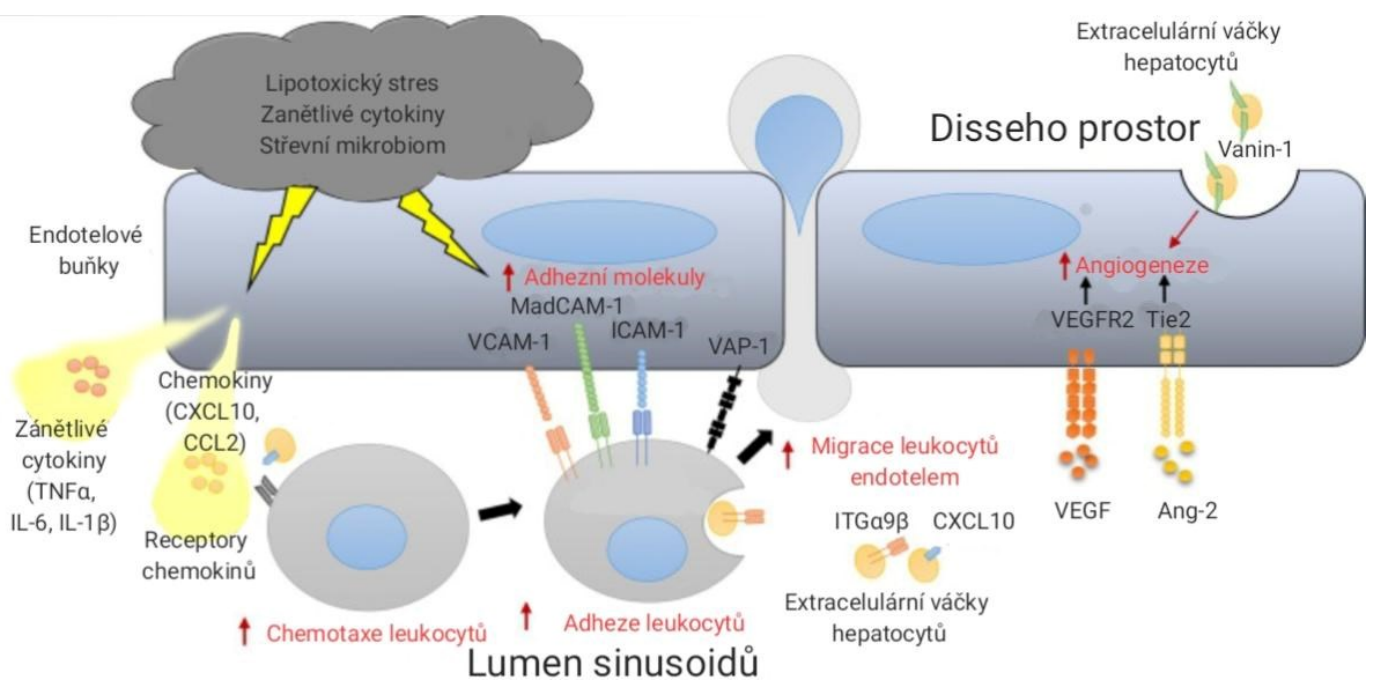
V normálních játrech působí endotelové buňky proti aktivaci hvězdicových buněk. Bylo zjištěno, že při kapilarizaci endotelu jater nedochází k tomuto bránění, a naopak endotelové buňky produkují profibrogenní molekuly jako Hedgehog proteiny, transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a laminin společně s fibronektinem. Tyto látky aktivují hvězdicové buňky, jenž prohlubují svoji aktivaci produkcí dalších Hedgehog proteinů. Fibróza při NASH vzniká následkem nadměrné tvorby mimobuněčné matrix hvězdicovými buňkami. (Hammoutene a Rautou, 2019)

Následkem jaterních onemocnění může být nález hepatocelulárního karcinomu. Během procesu růstu karcinomu ztrácí endotelové buňky markery jako stabilin-1 a 2, CD32b a hyaluronový receptor lymfatického endotelu 1 (LYVE-1). Snižuje se exprese intercelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1) na povrchu endotelových buněk a tím ztrácí leukocyty schopnost adherovat na buňky. Zvyšuje se tvorba intergrinů, které svým působením usnadňují adhezi rakovinných buněk. T lymfocyty vytváří imunopresivní prostředí, neboť si vyvinou toleranci k rakovinným antigenům. Protein vázající mastné kyseliny 4 (FABP4) produkovaný endotelovými buňkami a tukovou tkání je sérově zvýšen u pacientů s NAFLD. Tato látka má proonkogenní vlastnosti, neboť podporuje proliferaci jaterních buněk. Bylo zjištěno, že zvýšená angiogeneze má pozitivní vliv na tvorbu hepatocelulárního karcinomu. (Hammoutene a Rautou, 2019)

#### 4.2.4 Markery endotelové dysfunkce

Při probíhajícím zánětu endotelové buňky prezentují antigeny a jsou schopny navodit tvorbu interferonu IFN- $\gamma$  a interleukinů IL-4 a IL-10 CD4 T-lymfocyty. Kvůli adhezním molekulám a chemokinům se na endotel navážou leukocyty, které přecházejí přes endotel pomocí transcelulárního nebo paracelulárního transportu a vytváří zánětlivé ložisko. Před přilnutím leukocytů nastává takzvaný rolling leukocytů, který je zprostředkován receptory o nízké afinitě konkrétně selektiny a adrezy. Leukocyty s navázanými selektiny zvyšují prostřednictvím vnitřních signálů afinitu membránových integrinů, které se následně vážou na adhezní molekuly. (Cook-Mills et al., 2011; DeLeve a Maretti-Mira, 2017)

Mírný zánět má pozitivní účinky na jaterní tkáň, neboť navozuje znovuobnovu homeostázy současně také napomáhá opravě tkáně. Při dlouhodobém zánětu, který se vyskytuje při NASH, dochází k poškození nebo smrti jaterních buněk. Uložené tuky v hepatocytech mají na buňku toxický vliv, při kterém játra produkují větší množství extracelulárních váčků s obsahem prozánětlivých chemokinů a cytokinů (obrázek 5), což vyvolá adhezi monocytů k hepatocytům. Váčky konkrétně obsahují chemokinový (C-X-C motiv) ligand (CXCL10), integrin ITGα9β1 a Vanin-1, které působí chemotaxicky na monocyty. Za adhezi leukocytů, které přecházejí do místa zánětu, je převážně odpovědná molekula vaskulární buněčné adheze 1 (VCAM-1) společně s vaskulárním adhezním proteinem 1 (VAP-1) a ICAM-1. Další funkcí VAP-1 je aktivace hvězdicových buněk při zánětu, což vede k podpoře fibrózy. Endotelové buňky během NASH produkují prozánětlivé látky, jako je například IL-6, IL-1, TNFα a monocytový chemotaktický protein 1 (MCP1). K navození syntézy těchto látek a adhezních molekul musí být aktivován NF-κB, jehož aktivace je způsobená zánětem, lipotoxicitou a produkty ze střevních bakterií. (DeLeve a Maretti-Mira, 2017; Hammoutene a Rautou, 2019; Ibrahim, 2021)



Obrázek 5: Endotelová dysfunkce – upraveno

Převzané z: Ibrahim, 2021

Expresi adhezních molekul ovlivňují cytokiny, turbulentní proudění krve cévami, vysoké hodnoty ROS a mikrobiální stimulace endoteliálních toll-like receptorů. (Cook-Mills et al., 2011)

Angiopoetin společně s leptinem vedou k patologické aktivaci angiogeneze, což znamená, že dochází k tvorbě nových cév z již existujících cév. Při obezitě se objevuje nadbytek leptinu, který způsobuje aktivaci hvězdicových buněk a zvyšuje množství TGF- $\beta$  v endotelových a Kupfferových buňkách. Proti aktivaci hvězdicových buněk působí adiponektin, jenž vede k inhibici jejich funkce a následné apoptóze. Při NASH dochází ke snížení adiponektinu. Hodnoty leptinu jsou při NASH v séru vystupňované. (Hammoutene a Rautou, 2019; Hůlek a Urbánek, 2018)

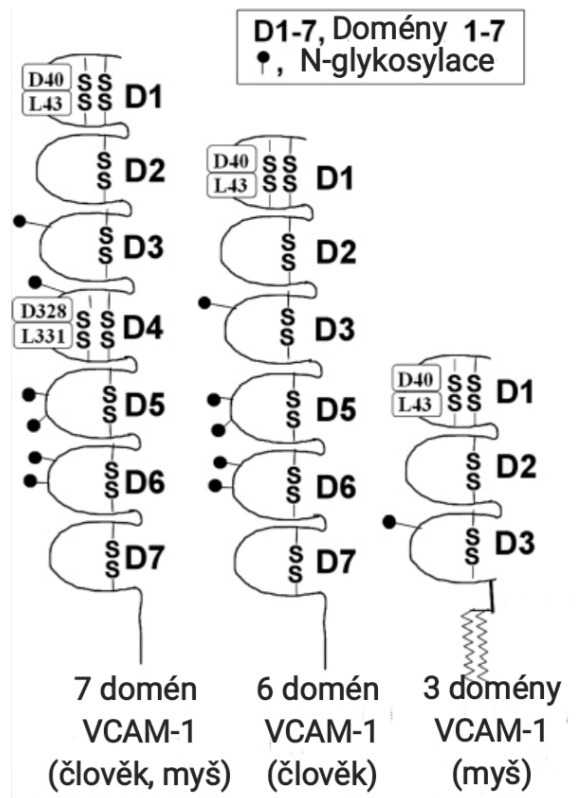
Fyziologicky přispívá angiopoetin-1 a 2 ke stabilitě cévního řečiště. U steatických jater podporuje angiopoetin-2 nefyziologickou angiogenezi. Hodnota tohoto proteinu je u pacientů s NASH v séru zvýšená, nesouvisí však s fibrózou, ale koreluje s poškozením tkáně zánětem, steatózou a balónováním hepatocytů. Zvýšená angiogeneze může podporovat zánět a fibrózu jater. Hlavní proangiogenní regulátor je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), jenž je zvýšený v séru pacientů se steatotickými játry. Jeho působení je podporováno hypoxií indukovaným faktorem (HIF), který se nachází v ložiscích s hypoxií, která nastává při zánětu. K angiogenezi přispívají i cytokiny a ROS. V extracelulárních váčcích hepatocytů se mimo jiné nacházejí proangiogenní látky. Dalším ukazatelem jaterní fibrózy při NASH je angiotenzin II, neboť zvyšuje proliferaci a aktivitu hvězdicových buněk. (Hammoutene a Rautou, 2019; Hůlek a Urbánek, 2018)

#### 4.2.4.1 VCAM-1

VCAM-1 neboli CD106 je jedním z proteinů podobných imunoglobulinům, který zajišťuje adhezi prozánětlivých monocytů k sinusoidní výstelce. Nachází se na laminárním a laterálním povrchu endotelových buněk nikoliv však na bazálním povrchu. V aktivovaných endotelových buňkách se VCAM-1 vyskytuje společně s ICAM-1 a s tetraspaniny CD9, CD81 a CD151, které vytvářejí mikrodoménu bohatou na tetraspanin. (Cook-Mills et al., 2011; Guo et al., 2022b)

VCAM-1 se skládá z několika domén, které jsou spojeny přes disulfidické vazby (obrázek 6). Obsahuje 7 extracelulárních domén, transmembránovou doménu a cytoplazmatickou doménu. Až na sedmou doménu mají ostatní extracelulární domény k sobě jednu jinou homogenní doménu. Každá z těchto domén obsahuje N-glykosylovaný konec, kterým se doména váže na galektin-3 na eozinofilech. U lidí nacházíme dvě sestřihové varianty. Buďto VCAM-1 obsahuje 7 domén připomínající

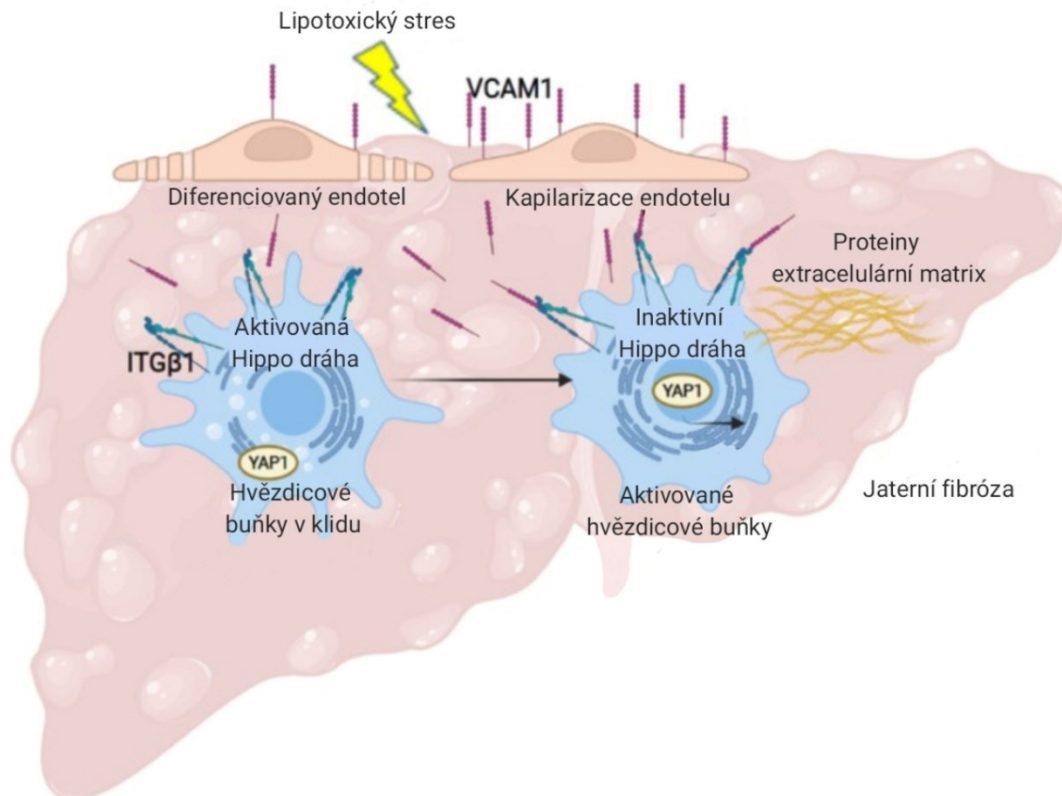
imunoglobuliny nebo šest domén, přičemž se postrádá čtvrtá doména. (Cook-Mills et al., 2011; Kong et al., 2018)



Obrázek 6: Varianty VCAM-1 – upraveno

Převzané z: Cook-Mills et al., 2011

Tuky toxicky způsobují zvýšenou expresi VCAM-1 přes mitogenem aktivované proteinové kinázy. VCAM-1 přispívá k rozvoji kapilarizace endotelu během NASH a k aktivaci hvězdicových buněk přes protein YAP1 (z anglického „YES associated protein“) přes Hippo signální dráhu (obrázek 7). Některé studie naznačují, že adhezni molekuly včetně VCAM-1 mohou aktivně změnit cytoskelet endotelových buněk. Jeho exprese se zvyšuje kromě NASH i při jiných zánětlivých onemocněních, jako je například ateroskleróza a astma. Exprese tohoto proteinu nemusí být specifická pro endotelové buňky, ale může se nacházet i na dendritických buňkách, tkáňových makrofázích, myoblastech, Kupfferových buňkách, hvězdicových buňkách atd. (Guo et al., 2022b; Kong et al., 2018)



Obrázek 7: Vliv VCAM-1 na tvorbu extracelulární matrix – upraveno

Převzané z: Guo et al., 2022b

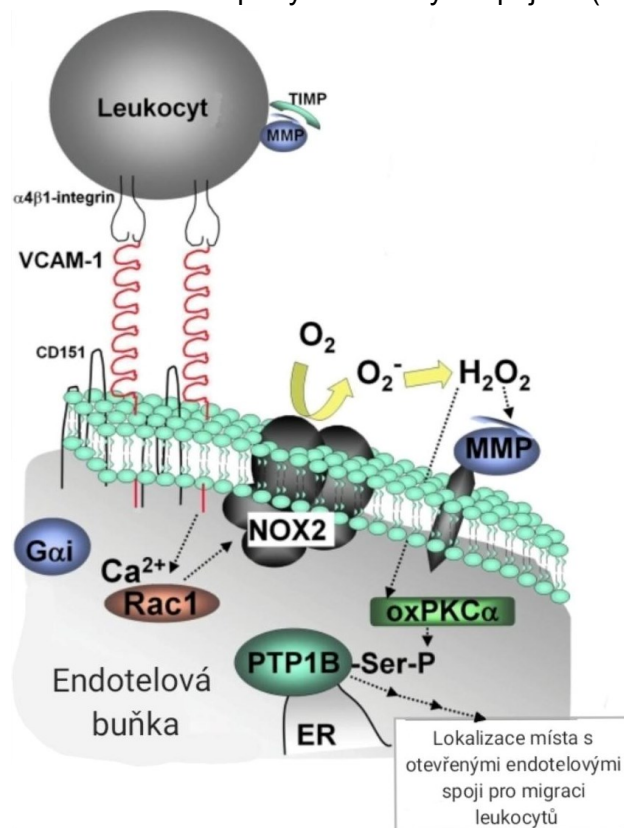
Expres VCAM-1 je navýšena při vysokých hodnotách ROS, glukózy, oxidovaném LDL (oxLDL) nebo 25-hydroxycholesterolu, při mikrobiální stimulaci endotelových buněk, při smykovém napětí a v přítomnosti prozánětlivých cytokinů a agonistů toll-like receptorů. Aktivace VCAM-1 genu je regulována pomocí NFκB faktoru a interferony, přičemž množství ROS je v přímé úměře se stimulací NFκB. (Cook-Mills et al., 2011; Kong et al., 2018)

VCAM-1 se váže na cirkulující leukocyty jako eozinofily, bazofily, lymfocyty a monocyty prostřednictvím integrinů  $\alpha 9\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 7$  a  $\alpha 4\beta 1$ . Nejvíce se váže na integrin  $\alpha 4\beta 1$ , přičemž s tímto integrinem interaguje i fibronektin a heparin. Konkrétně se  $\alpha 4\beta 1$  váže na VCAM-1 doménu 1, ke které se též váže  $\alpha 4\beta 7$  integrin, a méně na doménu 4, neboť k prostředkování vazby potřebuje větší afinitu. Vazby, které potřebují více afinity jsou pevnější a adheze integrinu k endotelu není narušena silou krevního toku. Aktivace integrinu je ovlivněna množstvím kationtů s oxidačním číslem +2. (Cook-Mills et al., 2011)

Při vazbě leukocytu na endotel dochází k přeměně plazmatické membrány endotelových buněk, které vytvoří prohlubeň, jenž obklopí leukocyt. Pravděpodobně

tomu tak je kvůli tomu, aby se utvořila pevnější adheze mezi buňkami a usnadnila se migrace leukocytu přes endotel. (Cook-Mills et al., 2011)

Aktivace VCAM-1 (obrázek 8) podporuje aktivaci vápenatých kanálů k uvolňování intracelulárního vápníku a aktivuje proteiny Gαi2 (inhibující α podjednotka G proteinu) a Rac1 (Ras související C3 botulotoxin substrát 1). Rac1 společně s vápenatými kationy aktivuje NADPH oxidázu 2 (NOX2), která syntetizuje superoxid, jenž dismutuje na malé množství peroxidu vodíku. Peroxid vodíku oxiduje matrixovou metaloproteinázu a difunduje do buňky přes buněčnou membránu, zatímco superoxid zůstává mimo buňku a aktivuje buněčnou protein kinázu Cα, přes kterou se aktivuje protein tyrozin fosfatázu 1B (PTP1B). Aktivace tohoto enzymu je nutná pro pohyb leukocytů do endotelu. Matrixové metaloproteinázy umožňují přechod leukocytů přes endotel, neboť jejich působením se rozkládá matrix a receptory v buněčných spojích. (Cook-Mills et al., 2011)



Obrázek 8: Signální dráha VCAM-1 – upraveno

Převzané z: Cook-Mills et al., 2011

Rac1 se též podílí na tvorbě aktinových vláken prostřednictvím indukce Rho proteinu. Způsobuje změny v cytoskeletu a spojích endotelových buněk. Aktivita Rac1 proteinu společně s produkcí ROS zvyšuje permeabilitu endotelu a leukocytární migraci. (Wittchen, 2009)



VCAM-1 se uplatňuje i v procesu angiogeneze a metastázování, neboť jeho zvýšený výskyt se prokázal při rakovinách postihujících různé systémy. Bylo zjištěno, že během rakovinného bujení je ve tkáních bohatých na VCAM-1 větší počet malých cév. Některé studie naznačují, že hodnota sérového VCAM-1 koreluje s angiogenezí a hustotou cév v tkáních během rakoviny. Expze tohoto proteinu endotelovými buňkami může být zvyšována VEGF faktorem. Inhibice VCAM-1 protilátkami může oba tyto procesy limitovat. (Kong et al., 2018)

VCAM-1 se v plazmě nachází v rozpustné formě. Jeho uvolnění z endotelového povrchu je způsobeno enzymem s disintegrinem a metalopeptidázovou doménou (ADAM) 17 a v některých případech i ADAM8 a ADAM9. (Cook-Mills et al., 2011)

#### 4.2.4.2 Endoglin

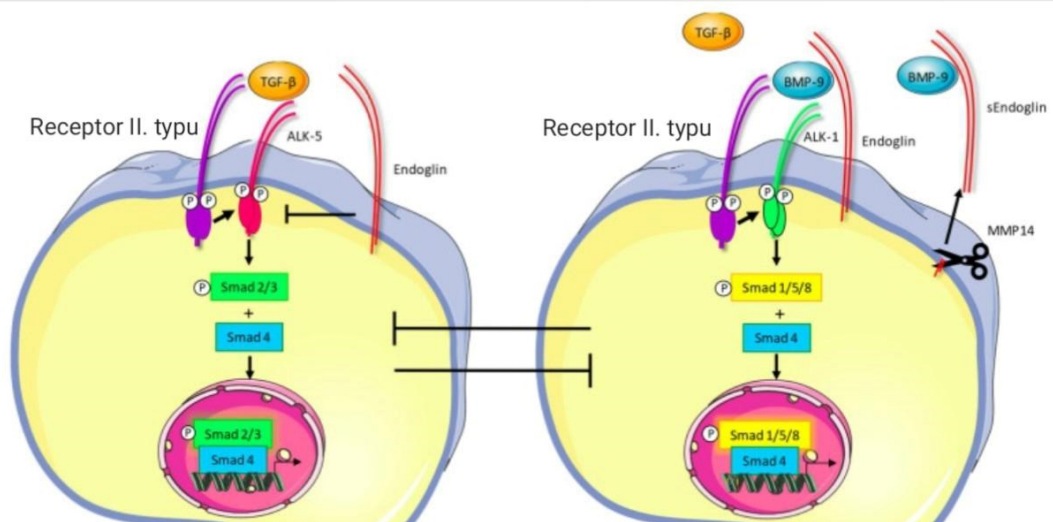
Endoglin (ENG) neboli CD105 spadá mezi transmembránové glykoproteiny. Skládá se ze dvou částí spojených disulfidickou vazbou. Tento glykoprotein vykazuje velkou mezidruhovou podobnost. V těle jej můžeme nalézt ve dvou formách. Buďto se jedná o rozpustnou formu endoglinu v plazmě nebo o membránovou neboli tkáňovou formu endoglinu. (Igreja Sá et al., 2020; Schoonderwoerd et al., 2020a)

Jeho krátká cytoplazmatická doména je odpovědná za jeho ko-receptorové vlastnosti, přičemž spíše přeměňuje signální odpověď, nežli ji spouští. Kromě krátké izoformy má endoglin i dlouhou izoformu, která je více exprimovaná. Názvy izoform jsou odvozeny od délek jejich cytoplazmatických konců, neboť krátká se skládá pouze ze 14 aminokyselin a dlouhá izoforma oproti tomu je složena z 47 aminokyselin. Izoformy se též liší v ovlivnění signálních drah. Krátký ENG podporuje ALK5 (kináza podobná aktinovým receptorům) dráhu, a naopak dlouhý ENG podporuje ALK1 signální dráhu, což vede k rozdílné aktivaci genů. U myší dlouhá izoforma při nadměrné expresi vyvolává fibrózu v ledvinách, přičemž krátký ENG snižuje ledvinnou fibrózu i zánět. (Schoonderwoerd et al., 2020a)

Bylo zjištěno, že u myší s expresí krátké izoformy a ICAM-2 reaguje endoglin méně na inhibici NO, což vedlo k hypertenzi. Endotelové buňky u těchto myší reagovaly méně na TGF- $\beta$ 1, a to spělo k myšlence, že zvýšená expze tohoto endoglinu je způsobená stárnutím buňky. (Schoonderwoerd et al., 2020a)

Expze endoglinu je ovlivňována také kostním morfogenetickým proteinem 9 (BMP-9) a hypoxií, která jeho expresi zvyšuje. BMP-9 patří do nadrodiny TGF- $\beta$ . (Igreja Sá et al., 2020; Schoonderwoerd et al., 2020a)

ENG reguluje signalizace TGF- $\beta$  faktorů, neboť je pro tyto růstové faktory ko-receptorem (obrázek 9). Působení TGF- $\beta$  faktorů je zprostředkováno přes navázání na ALK receptory. ENG reaguje však s TGF- $\beta$  pouze tehdy, je-li TGF- $\beta$ 1 nebo TGF- $\beta$ 3 spojen s TGF- $\beta$ RII, se kterým se vážou extracelulární i intracelulární domény ENG. Tyto domény současně zprostředkovávají vazbu s ALK5 receptory, a tím inhibuje ENG aktivitu těchto receptorů. Následkem inhibice ALK5 zprostředkované dráhy je zvýšená aktivace angiogeneze. Bez přítomnosti endoglinu fosforyluje ALK5 Smad2/3 (z anglického „small mothers against decapentaplegic“) a spolu se Smad4 se přesouvá do jádra buňky. Endoglin v komplexu s ALK1 na sebe váže BMP-9, přičemž tato afinita k BMP-9 je silnější než k TGF- $\beta$ 1. ALK1 dráha fosforyluje Smad1/5/8 proteiny, které se prostřednictvím Smad4 dostanou do jádra, kde vyvolají signály k proliferaci endotelových buněk a stimulaci angiogeneze. (Igreja Sá et al., 2020; Liu et al., 2020; Schoonderwoerd et al., 2020a)



Obrázek 9: Signální dráha endoglinu – upraveno

Převzané z: Liu et al., 2020

Schopnost exprese endoglinu vykazují nejen endotelové buňky, ale též fibroblasty, hvězdicové buňky, buňky hladkého svalstva a makrofágy. (Bus, 2018; Igreja Sá, 2020)

Za patologických podmínek ENG způsobuje větší aktivaci fibroblastů, které se akumulují ve tkáních a nastává proces fibrotizace. Primárně je příčinou fibrózy dlouhotrvající zánět, během kterého se z imunitních buněk vyplavují cytokiny, chemokiny a další faktory. Jedním z hlavních regulátorů fibroblastů je TGF- $\beta$ , kvůli kterému fibroblasty po navázání produkují velké množství extracelulární matrix a proteinů, které tuto matrix přeměňují anebo odstraňují. (Schoonderwoerd et al., 2020a)

Produktem reakce ENG s metaloproteinázami je solubilní endoglin, který dokáže vyvolat cévní poruchy. Solubilní forma ENG působí negativně na angiogenezi, neboť

dokáže vychytávat TGF- $\beta$ . Váže se na leukocytové integriny a tím blokuje jejich adhezi na endotelové buňky. (Igreja Sá et al., 2020; Schoonderwoerd et al., 2020a)

Následkem snížené exprese endoglinu endotelovými buňkami je zvýšená fosforylace proteinkinázy B. Aktivací této dráhy dochází k snížené expresi adhezních molekul i po stimulaci VEGF, údajně kvůli inhibici fosforylace aktivačního transkripčního faktoru 2 (ATF2), který dokáže regulovat expresi VCAM-1 genu. (Bus et al., 2018)

Vysoké hodnoty solubilního ENG v plazmě mohou kromě jiných onemocněních, jako je hypercholesterolemie, diabetes 2. typu a arteriální hypertenze, poukazovat na rozvoj fibrózy. Bylo zjištěno, že exprese tohoto glykoproteinu je zvýšena u aktivovaných hvězdčicových buněk. (Igreja Sá et al., 2020)

V předešlých studiích bylo zjištěno, že při různých onemocněních jako například při diabetické nefropatii koreluje množství exprimovaného endoglinu v tkáni s množstvím VCAM-1. (Bus et al., 2018)

### 4.3. Zvířecí modely jaterního poškození typu NAFLD

Ideální zvířecí model by měl po patofyziologické stránce připomínat co nejvíce lidské nemoci. Protože je jaterní steatóza spíše asymptomatické onemocnění, sledují se primárně játra postižená NASH. Tyto játra vykazují steatózu společně se zánětem a balónováním hepatocytů s určitým stupněm fibrózy. (Jahn et al., 2019)

#### 4.3.1 NAFLD modely s genetickými změnami

Myši s nedostatkem leptinu (ob/ob) se již dlouho využívají ke studiu NAFLD a jiných metabolických nemocí. Leptin je fyziologicky produkován v tukové tkáni, ale u ob/ob myši je tato produkce narušena kvůli bodové mutaci v ob genu. Nevýhodou ob/ob modelu je to, že u lidí s NAFLD chybí leptin jen minimálně. Většinou jsou sérové hladiny u pacientů s NAFLD normální anebo zvýšené. (Jahn et al., 2019)

Další skupinou modelových myši jsou myši s nefunkčním receptorem pro leptin neboli db/db myši, u kterých proběhla spontánní mutace v db genu, který je odpovědný za expresi leptinového receptoru. Tyto myši mají poškozenou signální dráhu leptinu a jsou rezistentní vůči hladinám tohoto hormonu. Oproti ob/ob myším jsou více náchylné na rozvoj jaterní fibrózy. U lidí se nedostatek tohoto receptoru vyskytuje ojediněle. (Jahn et al., 2019)

U LDL receptor (LDLr) deficientních myší nedochází k endocytóze LDL a přebytečný cholesterol zůstává v cirkulaci, což vede k rozvoji hypercholesterolemie. Obezita a inzulinová rezistence je u LDLr deficientních myší méně závažná. V minulosti se tyto myši využívaly převážně ke studiu aterosklerózy. (Jahn et al., 2019)

Lipoproteinové částice přenášející cholesterol a tuky se skládají mimo jiné i z lipoproteinu E. U myší s nedostatkem ApoE (apolipoprotein E) nastává hypercholesterolemie a hyperlipidémie jako následek špatného přečištění krve od tuků. Inzulinová rezistence se prokázala jen u některých myší. Při histologickém vyšetření je u ApoE deficientních myší viditelné ukládání kolagenu. (Jahn et al. 2019)

### 4.3.2 NAFLD modely indukované dietou

Myši s dietou s nedostatkem methioninu a cholinu (MCD) se v minulosti používaly nejvíce při studiu nástupu a vývoje NAFLD. Hlavní výhodou MCD myší je, že stačí podávání této stravy 2 až 8 týdnů k tomu, aby se u nich rozvinulo NAFLD ve formě fibrózy s předešlým zánětem a steatózou. K tomu, aby v hepatocytech probíhal správně metabolismus tuků, je důležité, aby v hepatocytu byla udržována určitá hladina methylových skupin. Předpokládá se, že po této stravě dochází ke snížení vylučování tuků jaterní buňkou prostřednictvím VLDL částic současně se zvýšením oxidačního stresu. Nevýhodou MCD modelu je to, že myši po této stravě výrazně zhubly, zvýšila se jim citlivost na inzulin a snížila se jim hladina cukru v krvi, avšak u většiny lidí k těmto změnám nedochází. (Jahn et al., 2019)

#### 4.3.2.1 Myši s dietou s nedostatkem cholinu (CD)

Aby se zabránilo přílišnému hubnutí myší byla zavedena CD dieta. Těmto myším se dávají normální nebo lehce snížené dávky methioninu bez přítomnosti cholinu. Myším se mohou podávat různé dávky L-aminokyselin, anebo snížené či zvýšené dávky tuků. Tyto myši během šesti až osmi týdnů na této stravě vykazují znaky NASH s velmi rozsáhlou fibrózou, která se do dvanácti měsíců vyvine u čtvrtiny myší v hepatocelulární karcinom. (Jahn et al., 2019)

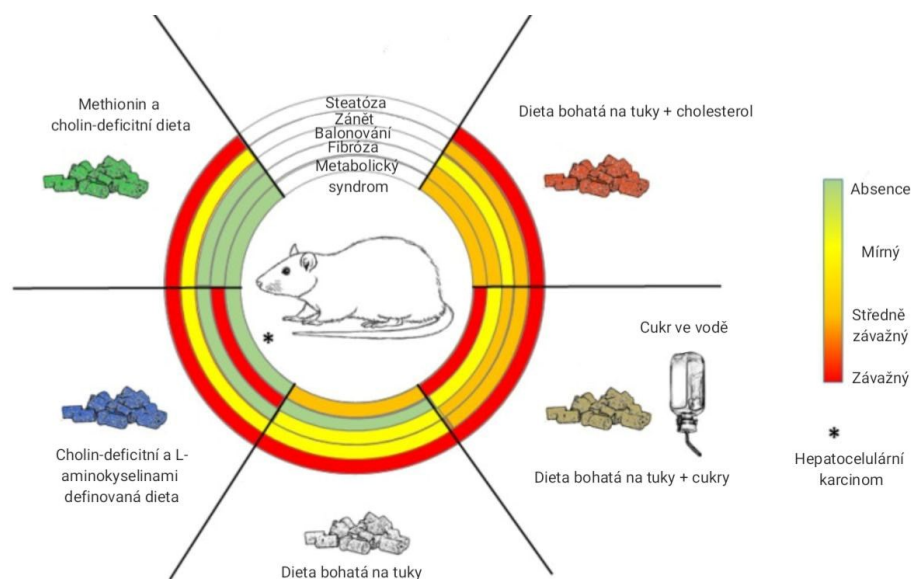
Mezi CD diety patří i cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná (CDAA) dieta, při které jsou proteiny nahrazeny stejným množstvím L-aminokyselin. Po této stravě byla snížena oxidace mastných kyselin v jaterních buňkách společně se zvýšeným oxidačním stresem. Pokles oxidace masných kyselin nastává kvůli redukci exprese enzymů acyl-koenzym A oxidázy 1 (ACOX-1) a karnitin palmitoyl transferázy 1A (CPT1A). U myších s CDAA dietou se může objevit inzulinová rezistence až po 22 týdnech,

k čemuž se pojí rozvoj obezity a zvýšené hodnoty cholesterolu a triglyceridů v krvi. Rozvoj inzulinové rezistence je pravděpodobně ovlivněn střevní mikroflórou. Po delší době výživy v podobě CDAA stravy je patrné zvýšení ALT hladin v krevních testech. (De Minicis et al., 2014; Flessa et al., 2022; Van Herck et al., 2017)

Zjistilo se, že u myší po CDAA stravě se snížila exprese fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK) enzymu a produkce glukóza-6-fosfátu již po jednom měsíci. Taktéž byla snížena produkce ChREBP ( z anglického „carbohydrate response element binding protein“) proteinu, který stimuluje lipogenezi. Ta tudíž nenastává. CDAA strava ovlivnila též expresi genů, které jsou významné při jaterním poškození nebo zánětu, a nastalo zvýšení produkce TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  atd. U CDAA diety je patrné větší ukládání kolagenu do hepatocytů. (De Minicis et al., 2014)

Při spojení CDAA stravy a vysokotukové stravy, kdy 60 % kcal bylo z tuků s malým přídávkem methioninu (0,1 %), došlo k rychlejší progresi onemocnění přesněji fibrózy zhruba do 9 týdnů. Tato strava se však nedoporučuje ke studiu metabolických změn, neboť u myší nejsou tyto změny patrné, přičemž u lidí je metabolický syndrom a obezita charakteristický pro NAFLD. V histologických řezech též není viditelné balónování hepatocytů. (Carreres et al., 2021; Flessa et al., 2022; Van Herck et al., 2017)

Strava bohatá na tuky (HFD) může obsahovat taktéž větší množství cukrů (převážně fruktóza a sacharóza) anebo cholesterolu, čímž vzniká velký počet rozdílných diet (obrázek 10). Diety se rovněž rozlišují v použitých tucích. Některá strava může být založena na kokosovém eventuálně sójovém oleji, anebo se využívají tuky ze zvířecích produktů jako je mléko či sádlo. Nevýhodou tohoto modelu je to, že trvá delší dobu, než se rozvine onemocnění a také je potřeba použít více myší, neboť na výsledky mají vliv interindividuální rozdíly. Naopak velkou výhodou těchto myší je, že lze u nich prokázat jak inzulinovou rezistenci a obezitu, ale také mikroskopicky jaterní fibróza a zánět. Některé myši dokonce trpěly hepatocelulárním karcinomem. (Jahn et al., 2019)



Obrázek 10: Rozvoj onemocnění u myší po různých dietách – upraveno

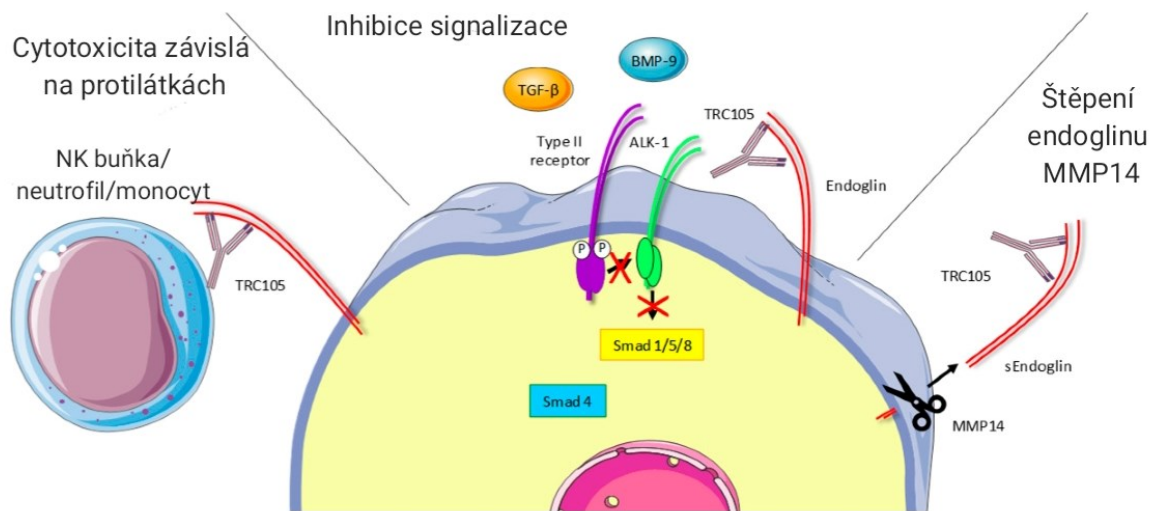
Převzané z: Carreres et al., 2021

### 4.3.7 Ostatní zvířecí modely

Kromě myší se ke studiu NAFLD používají prasata, králíci či krysy, kterých játra při vhodné stravě vykazují znaky NASH včetně fibrózy. Prasata a králíci se dají využít ke výzkumu NAFLD u dětí, neboť oproti myším dospívají pomaleji. Další výhodou prasečích modelů je to, že jejich metabolismus lipidů a cholesterolu se více podobá lidské fyziologii, než jsou hlodavčí modely podobné lidem. Ustájení těchto zvířat je však velmi náročné a genetické vlastnosti nejsou zcela prozkoumané. (Jahn et al., 2019)

## 4.4 Protilátka M1043

Tato protilátka byla vytvořena firmou TRACON Pharmaceuticals po zjištění, že protilátka TRC105 se váže na lidský endoglin, ale její afinita k myším endoglinu je snížena. M1043 tlumí signalizaci BMP-9 proteinu a váže se specificky na myší endoglin. Jedná se o monoklonální krysí IgG1 (imunoglobulin G1) protilátku, jenž nevyvolává buněčnou cytotoxicitu, čímž se liší oproti TRC105. Společně s TRC105 tlumí Smad1 fosforylaci v endotelových buňkách, která je vyvolána BMP-9 (obrázek 11). (Liu et al., 2020; Schoonderwoerd et al., 2020b)



Obrázek 11: Vazba TRC105 na endoglin – upraveno

Převzané z: Liu et al., 2020

Endoglin se kromě endotelu vyskytuje i na fibroblastech při rakovině prostaty a kolorektálním karcinomu. Při studiu léčby nádorů pomocí endoglinových protilátek, bylo zjištěno, že po imunizaci myší protilátkou TRC105 se v prvotních fázích onemocnění rozvinulo méně rakovinných tělísek o menším rozměru oproti kontrole. K tomuto závěru nedošlo při léčbě protilátkou M1043, ale při spojení endoglinových protilátek s PD1 (protein programované buněčné smrti 1) inhibitoru došlo k cílenému snížení počtu lézí a jejich velikostí. Použití samotného inhibitoru PD1 vedlo též k těmto závěrům, ale společný vliv endoglinových protilátek a inhibitoru byl více markantní. Tato studie se zaměřovala na rozvoj kolorektálního tumoru. Také bylo zjištěno, že při spojení PD1 a M1043 protilátek došlo ke snížení mortality a k silnější imunitní odpovědi paměťovými buňkami při transplantaci střevního nádoru do zdravých myší. Až u 20 % těchto modelů došlo k úplné regresi nádoru. (Schoonderwoerd et al., 2020b)

Po histologickém vyšetření myší po léčbě fibrózy M1043 protilátkou se na jaterních řezech prokázalo menší množství kolagenu. Také se zmenšila rozloha fibrózy oproti myším po léčbě s jinou krysí IgG1 protilátkou či myším s neléčeným NASH. Po léčbě M1043 se u myší snížily sérové hodnoty ALT a AST, množství uložených triacylglyceridů v játrech a též se snížil objem jater. Těto endoglinové protilátce se taktéž připisují protizánětlivé účinky a protektivní účinky, neboť po léčbě bylo patrné částečné utlumení zánětu. (Theuer, 2016)

## 4.5 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je vedle barvení hematoxylinem a eozinem jednou z nejdůležitějších diagnostických metod v patologii. Původně byla tato technika vyvinuta k detekci nádorových onemocnění. V dnešní době se však používá k identifikaci markerů onemocnění s možnou léčbou. Princip IHC závisí na specifické interakci buněčného či tkáňového antigenu nejčastěji s IgG protilátkou. Vazba mezi protilátkou a antigenem je způsobena hydrofobními, iontovými vazbami a vodíkovými můstky. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)

Monoklonální protilátky jsou nejčastěji získávány z myší, kterým se injekčně aplikoval imunogen. B-lymfocyty jsou buňky produkující protilátky, které se po imunitní reakci získají ze sleziny myši. B-lymfocyty mají omezené přežívání, proto se k nim přidávají myelomové buňky. Vznikají tak hybridní buňky (hybridomy), jenž produkují monoklonální protilátky, které se vážou specificky k jednomu antigenu, a jsou téměř nesmrtelné. Výhodou monoklonálních protilátek je, že jsou stejné mezi různými odběry. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)

Polyklonální protilátky jsou odebírány například z koně, králíka nebo z kozy. Oproti monoklonálním protilátkám mají větší afinitu, což je na úkor snížené specifity. Po podání imunogenu se protilátky ze zvířete získají jako součásti krevního séra. Hlavní výhodou polyklonálních protilátek je to, že jsou tvořeny z více klonů plazmatických buněk a dokáží se tak vázat na různé izoformy proteinu, které chceme detekovat. Nevýhodou je, že množství získaných protilátek je limitováno množstvím odebrané krve. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016 )

K tomu, aby se tkáň mohla využít k imunohistochemii, se nejdříve musí fixovat. Fixace zabraňuje autolýze a přemístění buněk, zachovává buněčné složky a připravuje tkáň na následné barvení. Nejčastěji se jako fixační činidlo používá formaldehyd. Chemická fixační činidla buď na sebe navážou dvě molekuly antigenu, což způsobí jejich stabilitu nebo způsobí jejich přeměnu na nerozpustné pevné látky či precipitaci. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)

Před samotnou IHC se musí řezy odparafinovat a poté se nechají v roztoku Tritonu X-100 nebo Tween 20 v PBS (fosfátový pufr), které rozruší plazmatickou membránu tím, že sami připomínají lipidovou membránu. Proteiny z plazmatické membrány přestupují na tyto činidla. Přes narušenou membránu mohou lépe pronikat protilátky do buňky. Při IHC je nutné používat neutrální pufr, neboť při změně pH může dojít k rozkladu tkáně.



Nejčastěji se používá PBS nebo TBS (tris(hydroxymethyl) aminomethan pufr). (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)

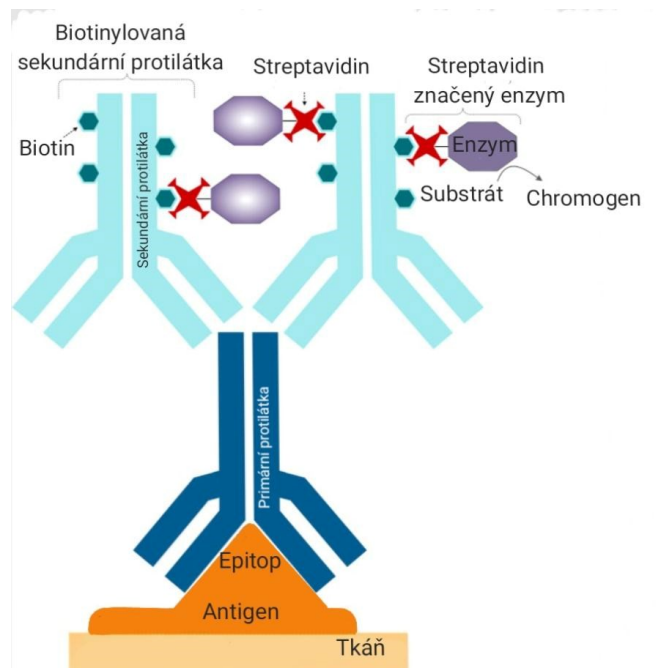
Během fixace formaldehydem může nastat navázání vápenatých iontů. Také může docházet k interakcím mezi proteiny navzájem anebo s nukleovými kyselinami, což dokáže vést k narušení nebo k zabránění viditelnosti antigenu. Tomu zabrání takzvaný antigen retrieval, kterého může být docíleno použitím mikrovlnných vln, vodní lázně, autoklávu atd. Přesný mechanismus není znám, ale pravděpodobně dochází k rozrušení interakcí mezi proteiny nebo k jejich extrakci či precipitaci a hydrolyze Schiffovým činidlem. U všech způsobů je potřeba použít chelatační činidlo jako je citrát či EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), aby nedošlo k vysušení tkáně. (Kabiraj et al., 2015)

Abyste nedocházelo k reakcím endogenních enzymů, jako je alkalická fosfatáza a peroxidáza s IHC činidly, nechávají se řezy v 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který blokuje peroxidázu. K zamezení vlivu alkalické fosfatázy se používá levamizol. Pokud se nezablokují tyto enzymy, mohou ovlivnit přesnost detekce, neboť mohou také přeměnit substrát na barevný produkt. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)

Jedním z nejčastějších problémů při IHC je nespecifická vazba primární a sekundární protilátky na jiné tkáňové proteiny. Blokovací média zamezí vazby primární protilátky na nečíslené antigeny. Blokovací média obsahují zvířecí séra s albuminem, který se váže na nežádoucí antigeny nebo se používá čistý hovězí sérový albumin. (Kalyuzhny, 2016)

IHC můžeme rozdělit podle typu detekce na přímou a nepřímou. Při přímé detekci je protilátka značená chromogenem. Pokud se na primární protilátku váže značená sekundární protilátka, jedná se o nepřímou metodu. Nevýhodou přímé metody je však to, že se u značené protilátky může snížit specifita a schopnost se vázat na daný antigen. Nepřímá metoda je více citlivá, neboť je možná vazba dvou značených sekundárních protilátek na jednu primární protilátku, a proto se i více používá v praxi. Sekundární protilátka může být značená buďto enzymem, který přemění substrát na barevný produkt, nebo fluorescenční molekulou. Výběr metody hlavně závisí na síle antigenu. Pro detekci silnějšího antigenu postačí využití přímé metody, naopak u slabého antigenu je vhodnější použít nepřímou metodu. (Kalyuzhny, 2016)

Již v osmdesátých letech minulého století byl vytvořen avidin-biotin komplex (ABC) (obrázek 12), který se skládá ze tří kroků. Jedná se o nepřímou detekci. Nejdříve se na daný antigen naváže primární protilátka, po které následuje sekundární protilátka značená biotinem. Poslední krok spočívá v navázání enzymu značeného streptavidinem či komplexu tvořeného tímto enzymem se streptavidinem a biotinem. Nejčastěji se jako enzym využívá křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza a glukosaoxidáza. Avidin a biotin mají velkou afinitu mezi sebou a tvoří silnou vazbu. Tato reakce je nevratná a nelze být smyta. Avidin dokáže vázat až 4 biotinové molekuly, ale kvůli stérickému bránění se většinou váže méně molekul. Streptavidin je získáván z bakterie *Streptomyces avidin*. Nevýhodou ABC je, že vazbou avidinu k biotinu vznikají velké molekuly, jenž mají sníženou schopnost pronikat do buňky. Z tohoto důvodu je též snížena citlivost. Při použití křenové peroxidázy se jako chromogenní substrát používá DAB (3,3'-diaminobenzidin), který po reakci s tímto enzymem tvoří hnědý produkt. Využívají se i jiné substráty, jako je například CN či p-fenylendiamin dihydrochlorid, ze kterých vzniká modrý produkt. (Kabiraj et al., 2015; Kalyuzhny, 2016)



Obrázek 12: Avidin-biotin komplex – upraveno

Převzané z: Murata et al., 2019

## 5. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je imunohistochemická analýza vlivu protilátky M1043 na expresi markerů endotelové dysfunkce, konkrétně VCAM-1 a endoglinu, na řezech myších jater s indukovanou nealkoholickou steatohepatitidou prostřednictvím CDAA-HFD diety.

## 6. Experimentální část

### 6.1 Experimentální zvířata

Experiment byl proveden na samcích myšního kmene C57BL/6J, kterým na začátku experimentu bylo 10 týdnů. Myši byly po dobu 8 týdnů krmené dietou CDAA-HFD. Samci byli rozděleni do skupin CDAA+rat IgG a CDAA+M1043 po 8 myších. Po 4 týdnech diety byla myším ze skupiny CDAA+rat IgG aplikována intraperitoneální injekce s potkaní protilátkou IgG o dávce 10 mg/kg. Myším ze skupiny CDAA+M1043 byla podávána protilátka injekce s protilátkou M1043 (10 mg/kg). Obě skupiny dostávaly tyto injekce dvakrát týdně po dobu dalších 4 týdnů. Úlohu kontrolní skupiny zajišťovala skupina myší, kterým se aplikovala IgG protilátka, neboť molekula M1043 je navázána na potkaní IgG. Tímto způsobem se eliminuje vliv samotné protilátky IgG na myší tkáň.

Zvířata měla volný přístup k potravě a vodě a byla chována ve Viváriu FaF UK HK. Usmrcení zvířat proběhlo pod hlubokou narkózou, přičemž poté jim byla odebrána krev z dolní duté žíly. Následně byla odebrána játra.

Všechny experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat dle zákona 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a vyhlášky 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat.

### 6.2 Princip metody

Játra myší byla fixována ve 4 % paraformaldehydu, zalita do parafínu a poté se tkáň nakrájela na 4,5  $\mu\text{m}$  tenké řezy na mikrotomu. Preparáty k imunohistochemické detekci vlivu protilátky M1043 byly vybrány na principu systematického náhodného výběru.

Preparáty se před samotným barvením musely odparafinovat, neboť parafin je nerozpustný ve vodě a bez odparafinování by se tkáň nemohla nabarvit vodnými barvami. Odparafinování proběhlo v řadě, která se skládala ze 3 xyleneových lázní a sestupné alkoholové řady (96 % etanol, 80 % etanol a 70% etanol). V každé lázni se sklíčka nechala po dobu 5 minut a poté se sklíčka na 5 minut dala do destilované vody či PBS, což je solný roztok s fosfátem o pH 7,4. Poté se sklíčka s řezy nechala v kvetě s 0,1 % roztokem Tritonu X-100 v PBS na 2 minuty. Triton narušil integritu buněčné membrány, což umožní průchod dalších činidel do nitra buňky. Sklíčka se omyla v PBS po dobu 2 minut. Aby došlo k odkrytí antigenních epitopů, bylo nutné provést takzvaný

antigen retrieval. Řezy pro detekci exprese endoglinu byly ponořeny do kyvety s pufrům Tris- EDTA o pH 9 a nechaly se 20 minut vařit ve vodní páře. Preparáty pro průkaz VCAM-1 se vařily taktéž ve vodní páře, ale v kyvetě s citrátovým pufrům o pH 6. Po vychladnutí se preparáty 2x omyly v PBS celkově na dobu 10 minut. V dalším kroku se sklíčka nechala 5 minut v 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aby se blokovaly endogenní peroxidázy, které by mohly reagovat s IHC činidly a následně se opláchla v PBS. Aby se v dalších krocích nemuselo používat velké množství roztoků a zamezilo se slítí roztoků ze sklíčka, obkreslily se tkáně hydrofobním perem DAKO PEN. Dále bylo zapotřebí blokovat jiné antigeny, aby nedošlo k nespecifickým reakcím. Toho se docílilo inkubací řezů s blokovacím roztokem 5 % mléka, který se připravil rozpuštěním 0,5 g netučného sušeného mléka v 10 ml PBS. Blokovací médium se nechalo působit 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Postup IHC metody se lišil v přípravě primárních protilátek, které se následně navázaly na stanovované proteiny. Primární protilátka proti endoglinu (ab221675) byla rozmíchána s 5 % mlékem v poměru 1 díl protilátky a 50 dílů mléka. Primární protilátka proti VCAM-1 molekule (CS#32653) se připravila v poměru 1:200 v 5 % mléce. Protilátky se po aplikaci na dané řezy nechaly působit přes noc při 4 °C.

Další den se řezy nechaly opláchnout 2x v PBS po dobu 5 minut. Biotinylovaná sekundární anti-králičí protilátka, která se váže na navázanou primární protilátku, se připravila v poměru 1:100 v PBS a nechala působit půl hodiny při laboratorní teplotě. Přebytek protilátky byl smyt při dvojitém oplachu v PBS. K detekci navázaných protilátek se použil avidin-biotin komplex (ABC), který se připravil podle výrobce (5 ml PBS s 1 kapkou roztoku A (avidin) a 1 kapkou roztoku B (biotinylovaná křenová peroxidáza)). Tento komplex by se měl před použitím inkubovat minimálně 30 minut a poté použít. Po uplynulé době se na sklíčka aplikovalo ABC po dobu 30 minut. Během dvojitého oplachu v PBS se připravilo DAB činidlo (1 ml rozpouštědla s 1 kapkou chromogenu). DAB slouží k vizualizaci sledované reakce, neboť v přítomnosti křenové peroxidázy tvoří hnědý produkt. Působení DAB činidla se musí přesně měřit. Sklíčka k detekci exprese endoglinu se nechala inkubovat s DAB činidlem po dobu 6 minut, a naopak sklíčka k detekci VCAM-1 se inkubovala 8 minut. Sklíčka následně byla opláchnutá v destilované vodě (5 minut). K nabarvení jaderné hmoty se použilo barvení Hematoxylinem po dobu 45 sekund, po kterém se sklíčka s řezy nechala modrat pod tekoucí vodou v průběhu 5 minut. Posledním krokem této metody bylo odvodnění preparátů. Sklíčka s řezy se odvodnila ve zpětné řadě od acetonu po xylen vždy po dobu

3 minut a následovalo montování sklíček pomocí Eukittu, montovacího média rozpustného v xylenu, a překrytí tkáně krycím sklíčkem.

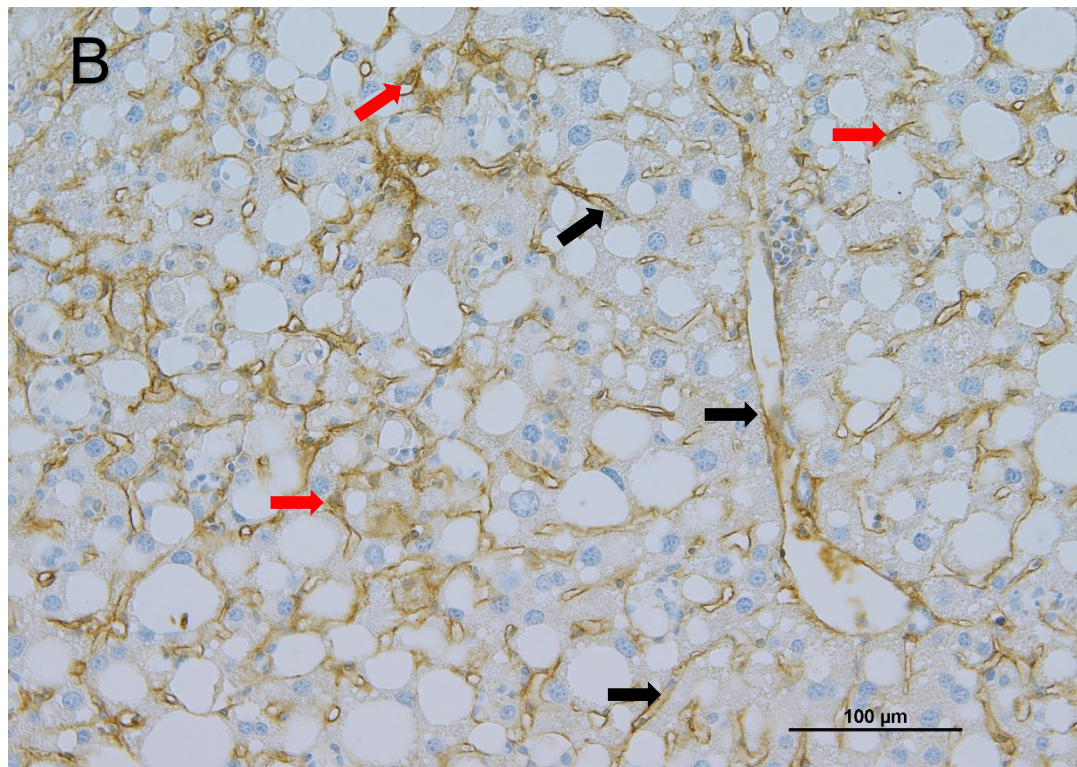
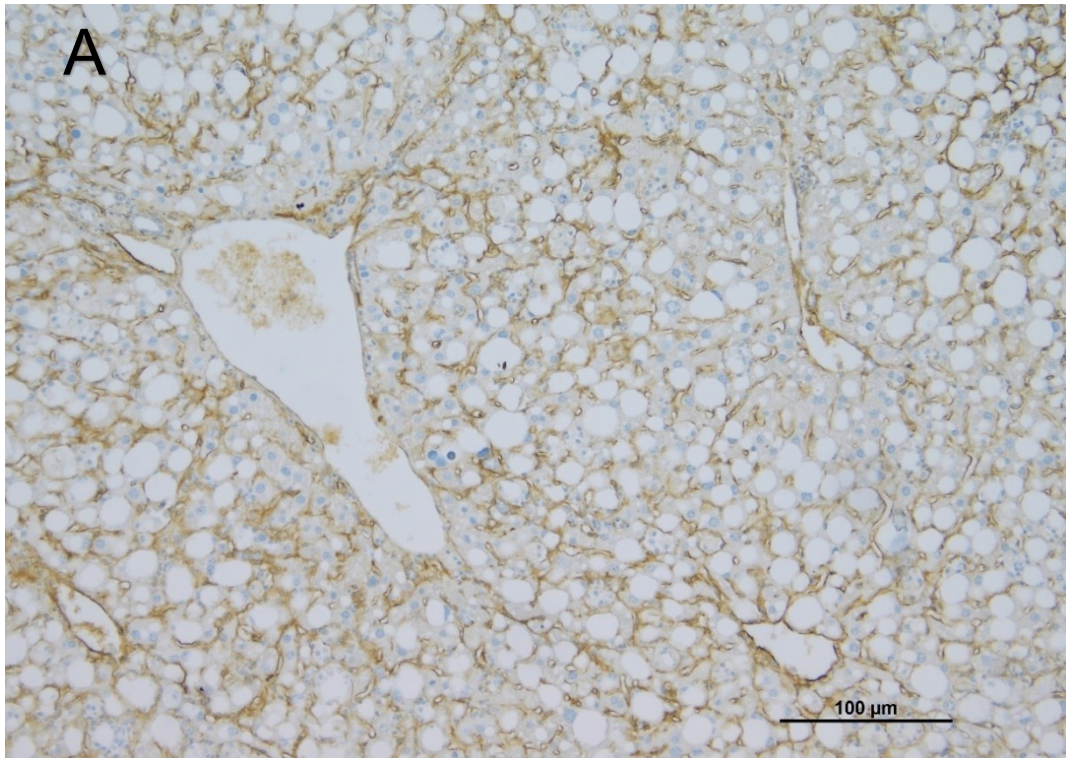
Preparáty byly pozorovány a fotodokumentace byla pořízena pomocí světelného mikroskopu Olympus AX70 vybaveného digitální kamerou Pixelink PL-A642.

## 7. Výsledky

Detekce exprese endoglinu i VCAM-1 byla provedena na 4 zvířatech z každé skupiny a z každého zvířete byly obarveny 3 preparáty.

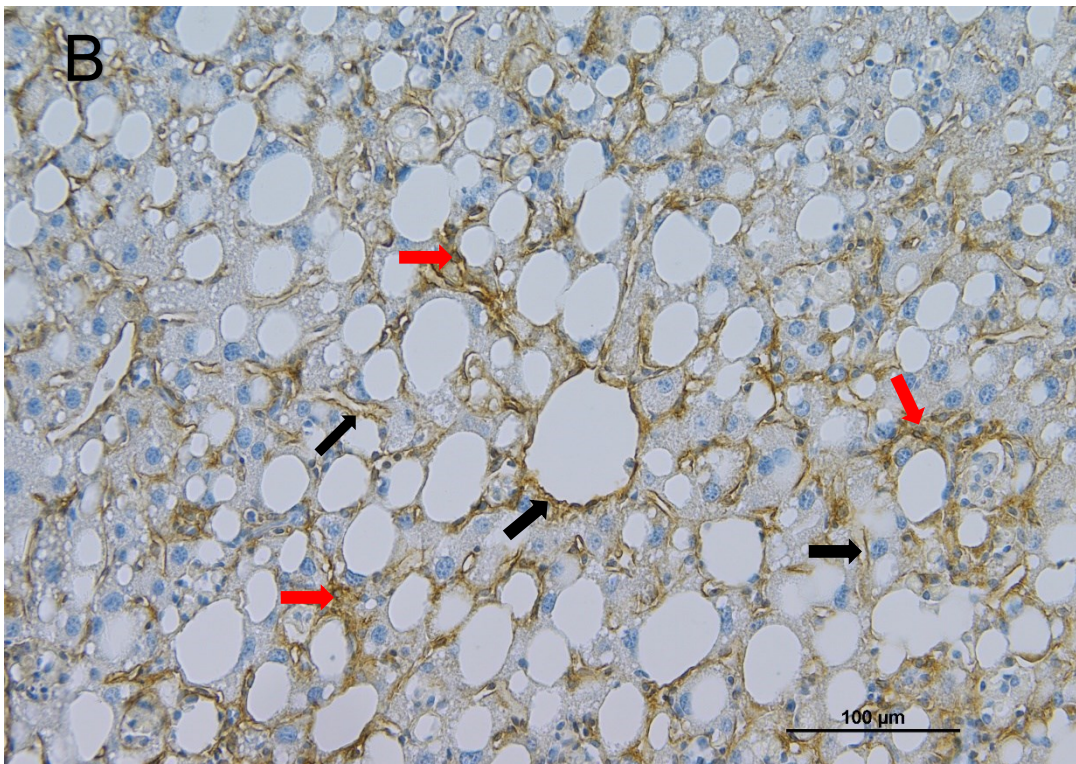
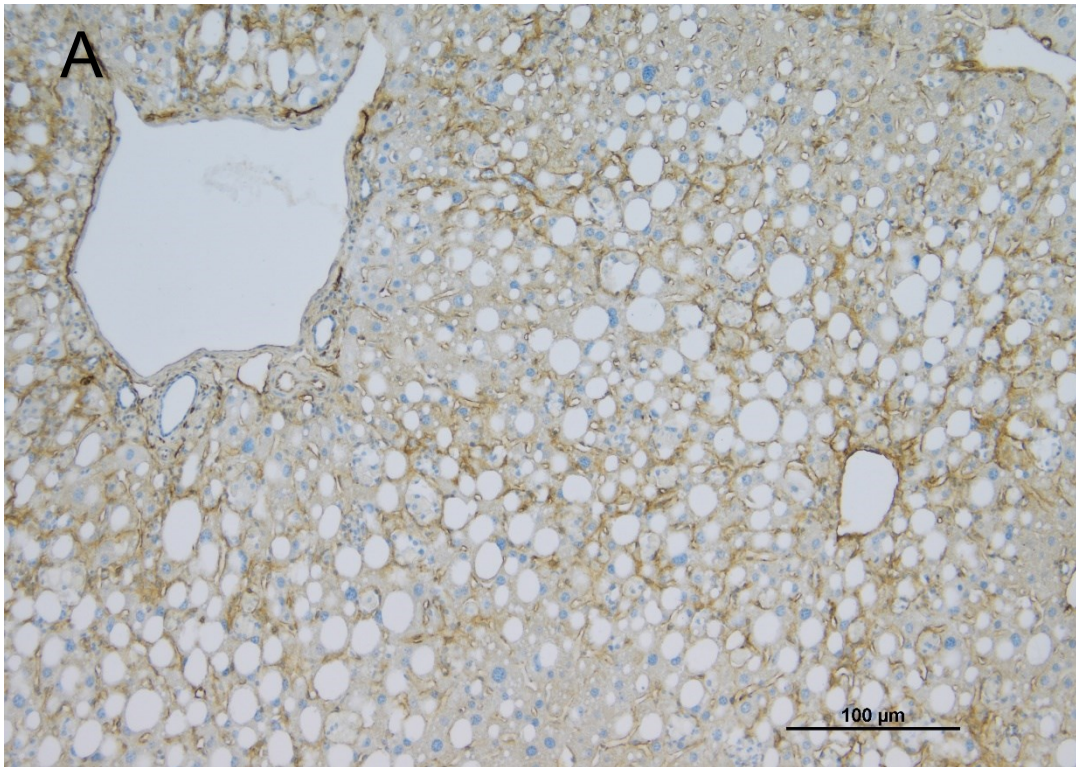
Při detekci exprese endoglinu jsme nezaznamenali žádný rozdíl v intenzitě ani rozsahu barevné reakce mezi skupinami (obrázek 13 a 14). Pozitivitu na endoglin jsme pozorovali zejména v endotelových buňkách jaterních cév, včetně sinusoidních kapilár. V menším rozsahu byla exprese endoglinu detekována i v aktivovaných jaterních hvězdicových buňkách (obrázek 13B a 14B, červená šipka).

Expese VCAM-1 byla rovněž soustředěna zejména v endotelových buňkách jaterních sinusoid ve stejném rozsahu ve skupině CDAA+rat IgG (obrázek 15) i CDAA+M1043 (obrázek 16), avšak tato exprese nebyla rovnoměrná v celé pozorované oblasti, jak tomu bylo u exprese endoglinu, exprese měla spíš ložiskový charakter. Překvapivá byla absence exprese v endotelových buňkách velkých cév, zejména v portobiliárním prostoru.

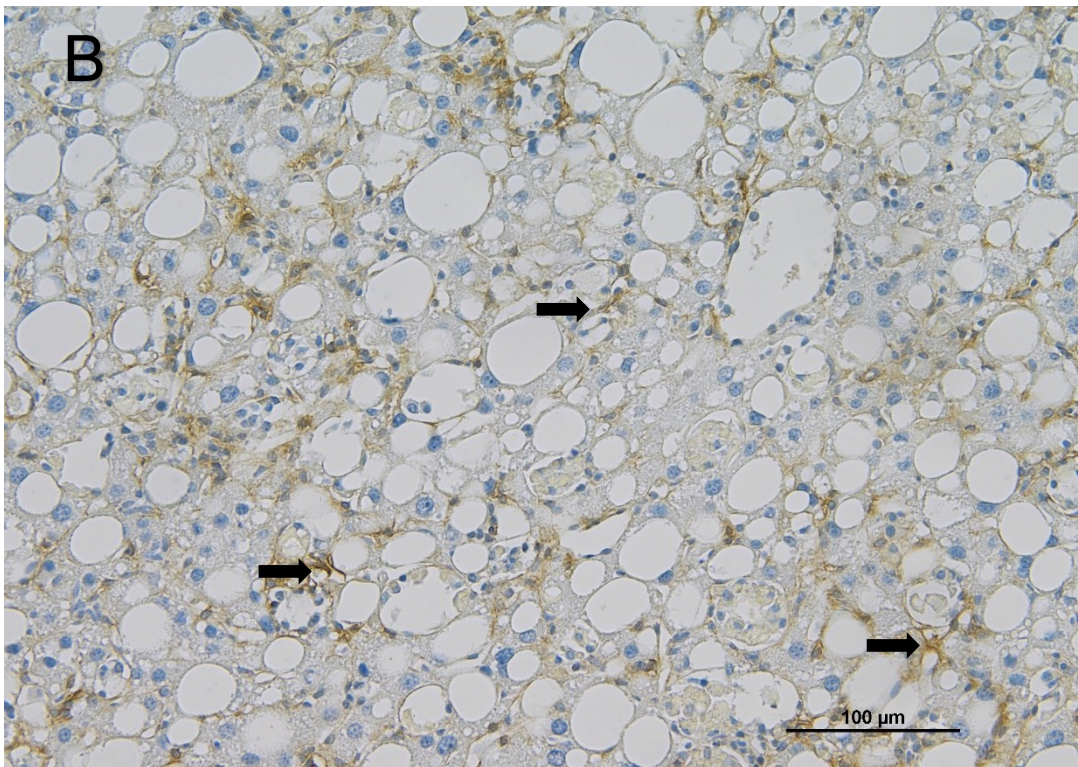
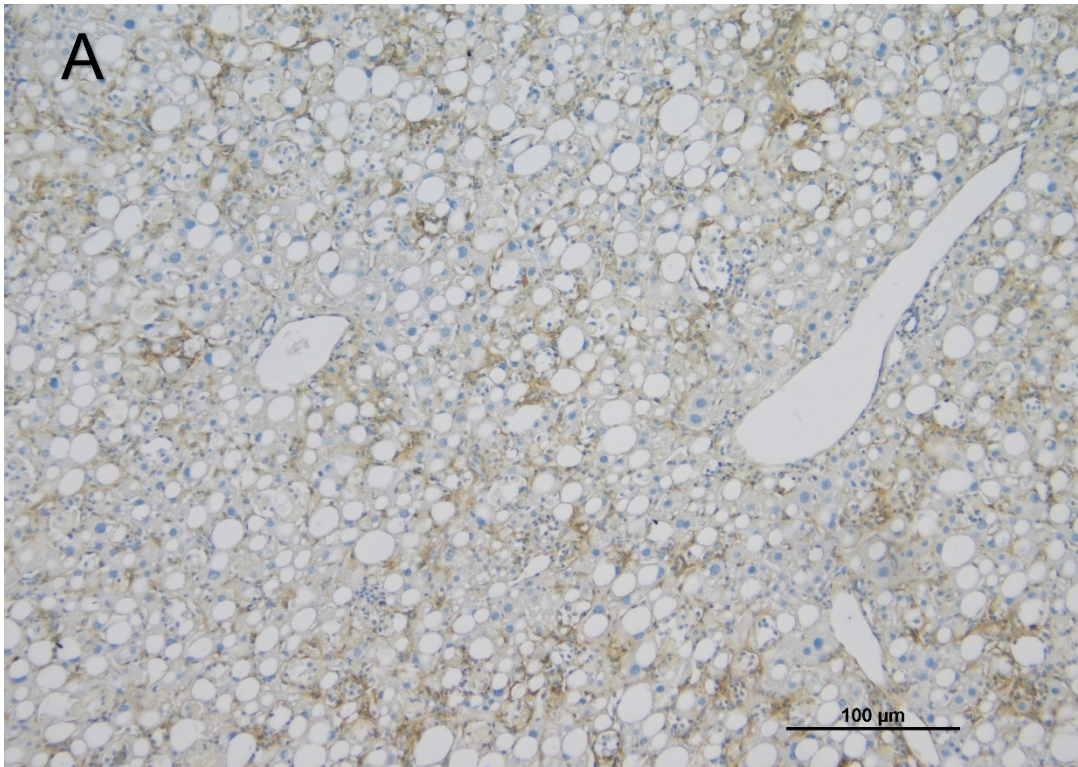


Obrázek 13: Reprezentativní fotografie detekce endoglinu u skupiny CDAA+rat IgG v endotelových buňkách (černé šipky) a v aktivovaných hvězdicových buňkách (červené šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B).

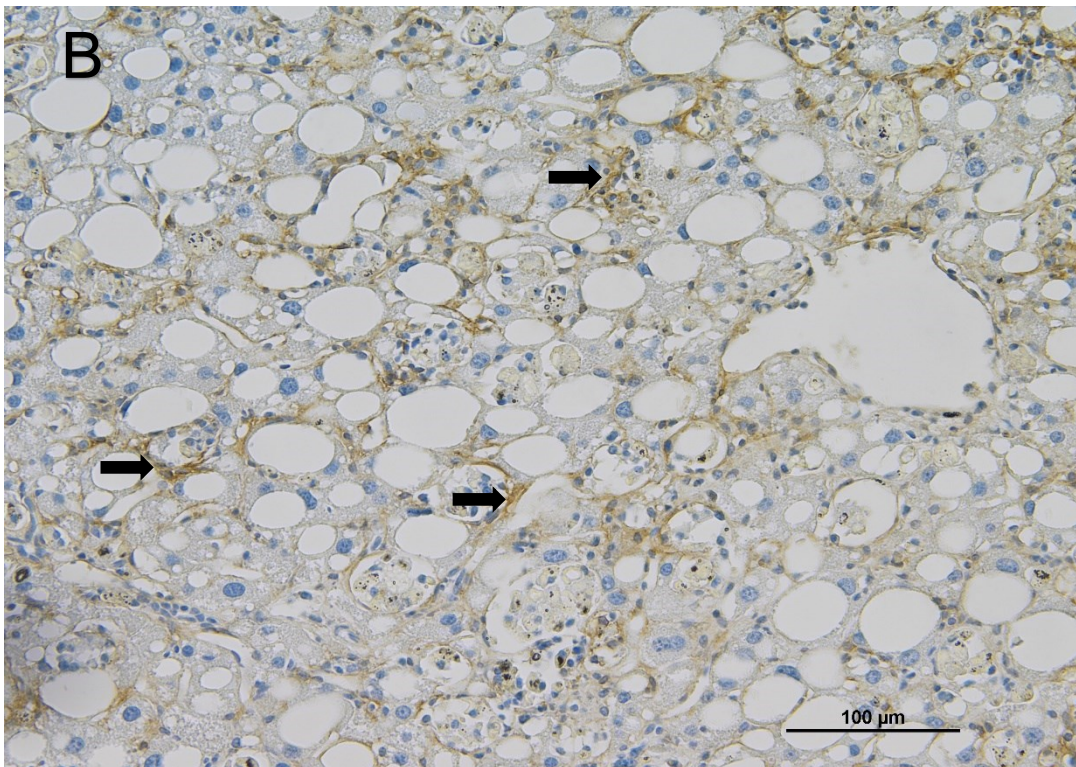
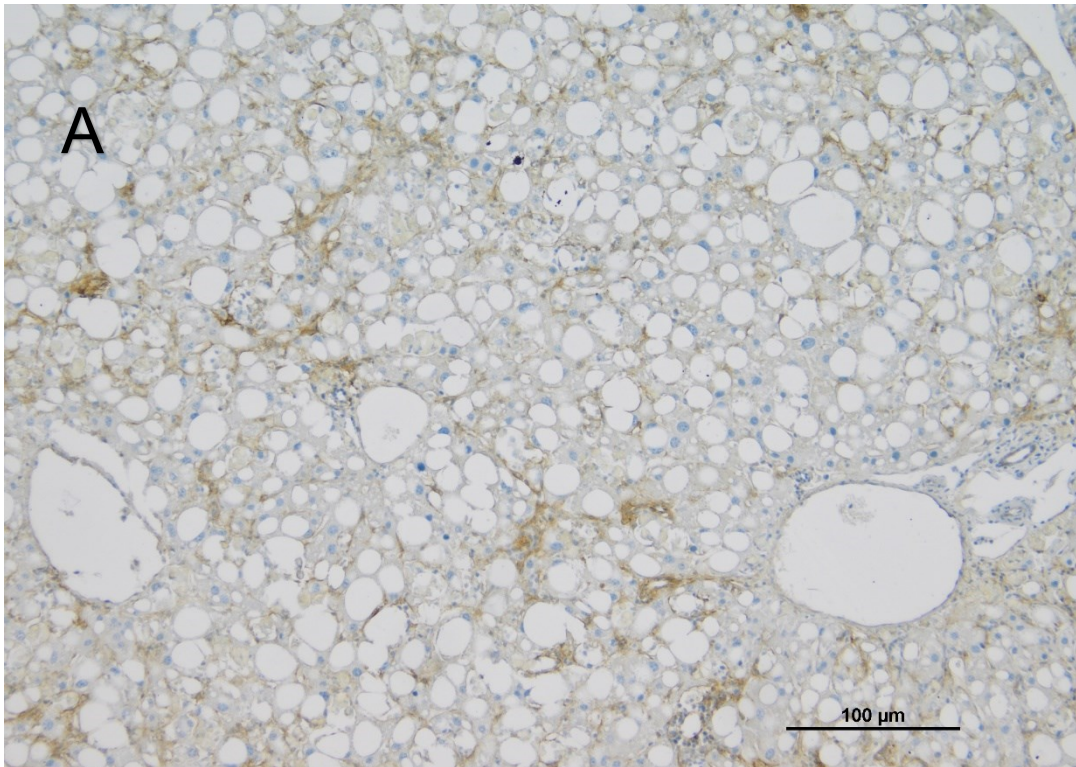




Obrázek 14: Reprezentativní fotografie exprese endoglinu u skupiny CDAA+M1043 v endotelových buňkách (černé šipky) a v aktivovaných hvězdicových buňkách (červené šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B).



Obrázek 15: Reprezentativní fotografie exprese VCAM-1 u skupiny CDAA+rat IgG v endotelových buňkách (černé šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B).



Obrázek 16: Reprezentativní fotografie exprese VCAM-1 u skupiny CDAA+M1043 v endotelových buňkách (černé šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B).

## 8. Diskuse

Nealkoholovými jaterními tukovými chorobami (NAFLD) trpí na světě okolo 30 % populace. NAFLD je jedním z faktorů, které přispívají ke vzniku chronických jaterních onemocnění a s nimi spojených komplikací jako je například cirhóza a rakovina jater. Obezita a diabetes mellitus 2. typu korelují s rozvojem NAFLD a progresí onemocnění k závažnějším formám, které vedou k transplantaci jater či k smrti. (Younossi et al., 2023)

Mezi NAFLD spadá nealkoholová steatohepatitida (NASH), která zahrnuje fibrózu a zánět, a později se může vyvinout v cirhózu a hepatocelulární karcinom. Bylo dokázáno, že rozvoj NAFLD ovlivňuje výskyt kardiovaskulárních onemocnění. Konkrétně se jedná o onemocnění jako hypertenze, kardiomyopatie, arytmie srdce či ischemická choroba srdeční, které jsou nejčastějším důvodem úmrtí u lidí s NAFLD. (Hůlek a Urbánek 2018; Kasper et al., 2021)

Endotelové sinusoidální buňky se nacházejí ve stěnách jaterních sinusoid. Tyto buňky jsou speciální tím, že obsahují takzvané fenestrace a produkují protizánětlivé a profibrotické působky. Již během několika týdnů stravy indukující NAFLD nastává u myší kapilarizace endotelových buněk, která podporuje další rozvoj v NASH a v hepatocelulární karcinom. (Velliou et al., 2023)

Endoglin je ko-receptor pro členy nadrodiny proteinů transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ). Rozlišujeme membránovou (ENG) a solubilní formu endoglinu (sENG). Kromě endotelových buněk je membránový endoglin exprimován též na profibrogenních buňkách jako jsou jaterní hvězdicové buňky, myofibroblasty a mesangialní buňky. Podle Meurera a kol. je exprese ENG navýšena při procesu angiogeneze, aktivace buněk monocytomakrofágového systému a hypoxii. Prokázali, že exprese endoglinu v jaterních hvězdicových buňkách byla zvýšena u dvou modelů jaterní fibrózy způsobené podvázáním žlučovéhoodu a indukci pomocí tetrachlórmetanu. (Meurer et al., 2011)

VCAM-1 je protein zprostředkovávající adhezi leukocytů k endotelovým buňkám. Podle studie vedené doktorem Furutem se exprese VCAM-1 proteinu zvýšila u myší po stravě bohaté na tuky, fruktózu a cholesterol, které představovaly model NASH onemocnění. Během studie testovali stejnou hypotézu na lidských endotelových buňkách a exprese VCAM-1 byla též zvýšená. (Furuta et al., 2021)

Na lidský endoglin se váže monoklonální anti-endoglinová protilátka TRC105 neboli carotuximab a blokuje jeho funkci. Při studiu vlivu této protilátky na endotelové buňky aorty *in vitro*, u kterých byla indukovaná endotelová dysfunkce cholesterolem a glukózou, bylo zjištěno, že TRC105 snižuje patologickou signalizaci přes SMAD dráhy. Přestože se zvýšila exprese adhezních molekul jako například VCAM-1, došlo ke sníženému průchodu leukocytů přes endotel. Tato studie poukazuje na možnosti využití TRC105 na léčbu onemocnění způsobených hypercholesterolémií a hyperglykemií. (Tripska et al., 2022)

Protilátka TRC105 má sníženou afinitu k myším endoglinu. Z toho důvodu byla vytvořena protilátka M1043. (Schoonderwoerd et al., 2020b)

Cílem této bakalářské práce bylo prokázání možného vlivu protilátky M1043 jako léčiva na expresi endoglinu a adhezní molekuly VCAM-1 u myšního modelu NASH založeného na podávání cholin-deficitní a L-aminokyselinami definované diety po dobu 8 týdnů. Po imunohistochemické analýze exprese endoglinu a VCAM-1 jsme nespozorovali markantní rozdíl v expresi endoglinu v endotelových či aktivovaných hvězdicových buňkách mezi kontrolní skupinou a skupinou, které se aplikovala protilátka M1043. Exprese proteinu VCAM-1 byla detekována v endotelových buňkách. Během experimentu nedošlo ke změně exprese VCAM-1 po aplikaci M1043 oproti kontrolní skupině. Protilátka M1043 zřejmě neovlivňuje expresi těchto markerů endotelové dysfunkce. Je však nutné poznamenat, že výsledky IHC detekce, která nemusí v mikroskopu odhalit malé rozdíly v expresi, je potřeba ověřit a potvrdit kvantitativním hodnocením barvení a rovněž je vhodné doplnit naše výsledky o kvantitativní hodnocení jinou molekulární metodou.

## 9. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla analýza exprese adhezní molekuly VCAM-1 a glykoproteinu endoglinu v endotelových buňkách jaterních sinusoid po léčbě protilátkou M1043. Expresi jsme detekovali na jaterních řezech myšního modelu NASH po zalití do parafínu a imunohistochemické detekci. Nebyl zpozorován rozdíl exprese sledovaných molekul mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou protilátkou M1043. Naše výsledky ukazují, že protilátka M1043 neovlivňuje expresi těchto markerů endotelové dysfunkce.

## Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam zkratky	Český význam
<b>Acox</b>	Acyl-coenzyme A oxidase	Acyl-koenzym A oxidáza
<b>ADAM</b>	A disintegrin-like and metalloproteinases	Enzymy s disintegrinem a metaloproteinázovou doménou
<b>ALK</b>	Activin receptor-like kinase	Kinázy podobné aktinovým receptorům
<b>ALT</b>	Alanine transaminase	Alaninaminotransferáza
<b>Ang</b>	Angiopoietin	Angiopoetin
<b>Apo</b>	Apolipoprotein	Apolipoprotein
<b>AST</b>	Aspartate transaminase	Aspartátaminotransferáza
<b>ATF</b>	Activating transcription factor	Aktivační transkripční faktor
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein	Kostní morfogenický protein
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand	Chemokin (C-C motiv) ligand
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	Diferenciační skupina
<b>CD diet</b>	Choline deficient diet	Dieta s nedostatkem cholinu
<b>CDAA</b>	Choline deficient L-amino-defined diet	Cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná dieta
<b>Cox</b>	Cyclooxygenase	Cyklooxygenáza
<b>CPT</b>	Carnitine palmitoyltransferase	Karnitin palmitoyl transferáza
<b>CXCL</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand	Chemokin (C-X-C motiv) ligand
<b>DAB</b>	3, 3'-diaminobenzidine	3,3'-diaminobenzidin
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetraacetic acid	Kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ENG</b>	Endoglin	Endoglin
<b>eNOS</b>	Endothelial NOS	Endotelová NOS
<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
<b>FABP</b>	Fatty acid-binding protein	Protein vázající mastné kyseliny
<b>Gai</b>	Inhibitory G protein $\alpha$ subunit	Inhibující $\alpha$ podjednotka G proteinu
<b>HDL</b>	High density lipoproteins	Lipoprotein s vysokou hustotou

<b>HIF</b>	Hypoxia inducible factor	Hypoxií indukovaný faktor
<b>HMGB</b>	High mobility group box protein, amphoterin	Amphoterin
<b>ChREBP</b>	Carbohydrate response element binding protein	
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule	Intercelulární adhezní molekula
<b>IFN</b>	Interferon	Interferon
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	Imunoglobulin G
<b>IHC</b>	Imunohistochemistry	Imunohistochemie
<b>IL</b>	Interleukin	Interleukin
<b>ITG</b>	Integrin	Integrin
<b>LDL</b>	Low density lipoproteins	Lipoprotein s nízkou hustotou
<b>LDLr</b>	Low density lipoproteins receptor	Receptor lipoproteinů s nízkou hustotou
<b>LOX</b>	Lipoxygenase	Lipoxygenáza
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide	Lipopolysacharid
<b>LYVE</b>	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor	Hyaluronový receptor lymfatického endotelu
<b>MAdCAM</b>	Mucosal addressin cell adhesion molecule	Mukózní adhezní molekula
<b>MCD</b>	Methionine-choline deficient diet	Dieta s nedostatkem methioninu a cholinu
<b>MCP</b>	Monocyte chemoattractant protein	Monocytový chemotaktický protein
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase	Matrix metaloproteináza
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen	Redukovaný nikotinamin adenin dinukleotid fofát
<b>NAFLD</b>	Nonalcoholic fatty liver disease	Nealkoholová tuková choroba jater
<b>NASH</b>	Nonalcoholic steatohepatis	Nealkoholová steatohepatida
<b>NF</b>	Nuclear factor	Nukleární faktor
<b>NOX</b>	NADPH oxidase	NADPH oxidáza
<b>oxLDL</b>	Oxidized LDL	Oxidovaný LDL
<b>oxPKC</b>	Oxidized protein kinase C	Oxidovaná protein kináza C



<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline	Fosfátový pufr
<b>PD</b>	Programmed cell death protein	Protein programované buněčné smrti
<b>PEMT</b>	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	Fosfatidylethanolamin-N-metyltransferáza
<b>PEPCK</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Fosfoenolpyruvát karboxykináza
<b>PLVAP</b>	Plasmalemma vesicle-associated protein	Protein asociovaný s plazmatickými vezikuly
<b>PNPLA</b>	Patatin-like phospholipase domain	Palatinu podobná lipázová doména
<b>PTGF</b>	Placental transforming growth factor	Placentární transformující růstový faktor
<b>PTP</b>	Protein tyrosine phosphatase	Protein tyrozin fosfatáza
<b>Rac</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate	Ras související C3 botulotoxin substrát
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	Reaktivní forma kyslíku
<b>sENG</b>	Soluble endoglin	Rozpustný endoglin
<b>SMAD</b>	Small mothers against decapentaplegic	
<b>SREBP</b>	Sterol regulatory element binding protein	Protein vázající se na sterol-regulační element
<b>TBS</b>	Tris buffered saline, Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline	Tris pufr, Tris(hydroxymethyl)aminomethan pufr
<b>TCR</b>	T-cell receptor	T-buněčný receptor
<b>TGF</b>	Transforming growth factor	Transformující růstový faktor
<b>TM6SF2</b>	Transmembrane 6 superfamily member 2	Transmembránový protein 6. členu nadrodiny 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor	Ligandový receptor vyvolávající apoptózu spojenou s tumor nekrotizujícím faktorem
<b>VAP</b>	Vascular adhesion protein	Vaskulární adhezni protein
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule	Molekula vaskulární buněčné adheze

<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endotelový růstový faktor
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor	Receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein	Lipoprotein s velmi nízkou hustotou
<b>Yap</b>	Yes-associated protein	

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura jaterního lalůčku .....	11
Obrázek 2: Rozdělení jaterního parenchymu .....	11
Obrázek 3: NAFLD spektrum – upraveno .....	15
Obrázek 4: Schéma patogeneze NASH – upraveno .....	16
Obrázek 5: Endotelová dysfunkce – upraveno .....	20
Obrázek 6: Varianty VCAM-1 – upraveno .....	22
Obrázek 7: Vliv VCAM-1 na tvorbu extracelulární matrix – upraveno .....	23
Obrázek 8: Signální dráha VCAM-1 – upraveno .....	24
Obrázek 9: Signální dráha endoglinu – upraveno .....	26
Obrázek 10: Rozvoj onemocnění u myši po různých dietách – upraveno .....	30
Obrázek 11: Vazba TRC105 na endoglin – upraveno .....	31
Obrázek 12: Avidin-biotin komplex – upraveno .....	34
Obrázek 13: Reprezentativní fotografie detekce endoglinu u skupiny CDAA+rat IgG v endotelových buňkách (černé šipky) a v aktivovaných hvězdicových buňkách (červené šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B) .....	40
Obrázek 14: Reprezentativní fotografie exprese endoglinu u skupiny CDAA+M1043 v endotelových buňkách (černé šipky) a v aktivovaných hvězdicových buňkách (červené šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B) .....	41
Obrázek 15: Reprezentativní fotografie exprese VCAM-1 u skupiny CDAA+rat IgG v endotelových buňkách (černé šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B) .....	42
Obrázek 16: Reprezentativní fotografie exprese VCAM-1 u skupiny CDAA+M1043 v endotelových buňkách (černé šipky) při zvětšení 100x (A) a 200x (B) .....	43

## Zdroje obrázků

CARRERES, Lydie, Zuzana Macek JÍLKOVÁ, Guillaume VIAL, Patrice N. MARCHE, Thomas DECAENS a Hervé LERAT, 2021. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines* [online]. **9**(4), 378. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9040378

COOK-MILLS, Joan M., Michelle E. MARCHESE a Hiam ABDALA-VALENCIA, 2011. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **15**(6), 1607–1638. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2010.3522

FONTANA, Josef, Martina ŠAJDLÍKOVÁ a Patrik Maďa, 2014. Játra a biotransformace xenobiotik. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. [cit. 2024-05-06]. Dostupné z: <https://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

GUO, Qianqian, Kunimaro FURUTA, Shahidul ISLAM, Nunzia CAPORARELLO, Enis KOSTALLARI, Kobe DIEELIS, Daniel J. TSCHUMPERLIN, Petra HIRSOVA a Samar H. IBRAHIM, 2022b. Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis. *Frontiers in Immunology* [online]. **13**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.983255

GUO, Xiangyu, Xunzhe YIN, Zuoqia LIU a Jin WANG, 2022a. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(24), 15489. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232415489

IBRAHIM, Samar H., 2021. Sinusoidal endotheliopathy in nonalcoholic steatohepatitis: therapeutic implications. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. **321**(1), G67–G74. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00009.2021

KIM, Kook Hwan a Myung-Shik LEE, 2018. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis and Hormone-Based Therapeutic Approaches. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **9**. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00485

LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS, 2020. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International*

*Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(1), 147. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22010147

MURATA, Lauren B., Patrick BRUNHOEBER, June CLEMENTS, Ehab A. ELGABRY, Janine FENG, Monesh KAPADIA, Amita MISTRY, Shalini SINGH a Eric E. WALK, 2019. Immunohistochemistry. In: *Companion and Complementary Diagnostics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 53–91. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813539-6.00004-3

## Seznam literatury

ALSAMMAN, Muhammad, Viktor STERZER, Steffen K. MEURER, Hacer SAHIN, Ute SCHAEFER, Deniz KUSCUOGLU, Pavel STRNAD, Ralf WEISKIRCHEN, Christian TRAUTWEIN a David SCHOLTEN, 2018. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis—A protective factor against liver fibrosis. *Liver International* [online]. **38**(5), 858–867. ISSN 1478-3223. Dostupné z: doi:10.1111/liv.13595

BUS, Pascal, Tessa GERRITS, Sharon A.C. HEEMSKERK, Malu ZANDBERGEN, Ron WOLTERBEEK, Jan A. BRUIJN, Hans J. BAELDE a Marion SCHARPFENECKER, 2018. Endoglin Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-A–Induced Endothelial Cell Activation by Regulating Akt Signaling. *The American Journal of Pathology* [online]. **188**(12), 2924–2935. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2018.08.005

BYRNE, Christopher D. a Giovanni TARGHER, 2015. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology* [online]. **62**(1), S47–S64. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2014.12.012

CARRERES, Lydie, Zuzana Macek JÍLKOVÁ, Guillaume VIAL, Patrice N. MARCHE, Thomas DECAENS a Hervé LERAT, 2021. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines* [online]. **9**(4), 378. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9040378

COOK-MILLS, Joan M., Michelle E. MARCHESE a Hiam ABDALA-VALENCIA, 2011. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **15**(6), 1607–1638. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2010.3522

ČIHÁK, Radomír, 2002. *Anatomie 2*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-0143-1.

DE MINICIS, Samuele, Laura AGOSTINELLI, Chiara RYCHLICKI, Gian Pio SORICE, Stefania SACCOMANNO, Cinzia CANDELARESI, Andrea GIACCARI, Luciano TROZZI, Irene PIERANTONELLI, Eleonora MINGARELLI, Marco MARZIONI, Giovanna MUSCOGIURI, Melania GAGGINI, Antonio BENEDETTI, Amalia GASTALDELLI, Maria GUIDO a Gianluca SVEGLIATI-BARONI, 2014. HCC Development Is Associated to

Peripheral Insulin Resistance in a Mouse Model of NASH. *PLoS ONE* [online]. **9**(5), e97136. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0097136

DELEVE, Laurie a Ana MARETTI-MIRA, 2017. Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Seminars in Liver Disease* [online]. **37**(04), 377–387. ISSN 0272-8087. Dostupné z: doi:10.1055/s-0037-1617455

EISSAZADEH, Samira, SeyedehNiloufar MOHAMMADI, Fatemeh Alaei FARADONBEH, Jana Urbankova RATHOUSKA, Ivana NEMECKOVA, Katarina TRIPSKA, Barbora VITVEROVA, Ester DOHNALKOVA, Martina VASINOVA, Petra FIKROVA, Ivone Cristina Igreja SA, Stanislav MICUDA a Petr NACHTIGAL, 2024. Endoglin and soluble endoglin in liver sinusoidal endothelial dysfunction in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. **1870**(3), 166990. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2023.166990

FLESSA, Christina-Maria, Narjes NASIRI-ANSARI, Ioannis KYROU, Bianca M. LECA, Maria LIANOU, Antonios CHATZIGEORGIOU, Gregory KALTSAS, Eva KASSI a Harpal S. RANDEVA, 2022. Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(24), 15791. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232415791

FURUTA, Kunimaro, Qianqian GUO, Kevin D. PAVELKO, Jeong-Heon LEE, Keith D. ROBERTSON, Yasuhiko NAKAO, Jan MELEK, Vijay H. SHAH, Petra HIRSOVA a Samar H. IBRAHIM, 2021. Lipid-induced endothelial vascular cell adhesion molecule 1 promotes nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **131**(6). ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI143690

FURUTA, Kunimaro, Xiaofang TANG, Shahidul ISLAM, Alonso TAPIA, Zhen Bouman CHEN a Samar H. IBRAHIM, 2023. Endotheliopathy in the metabolic syndrome: Mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **244**, 108372. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108372

GARCIA-MONZÓN, Carmelo, Elena MARTÍN-PÉREZ, Oreste Lo IACONO, Miguel FERNÁNDEZ-BERMEJO, Pedro L MAJANO, Arantxa APOLINARIO, Eduardo LARRAÑAGA a Ricardo MORENO-OTERO, 2000. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *Journal of Hepatology* [online]. **33**(5), 716–724. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-8278(00)80301-3

GUO, Qianqian, Kunimaro FURUTA, Shahidul ISLAM, Nunzia CAPORARELLO, Enis KOSTALLARI, Kobe DIEELIS, Daniel J. TSCHUMPERLIN, Petra HIRSOVA a Samar H. IBRAHIM, 2022. Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis. *Frontiers in Immunology* [online]. **13**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.983255

HAMMOUTENE, Adel a Pierre-Emmanuel RAUTOU, 2019. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* [online]. **70**(6), 1278–1291. ISSN 01688278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2019.02.012

HŮLEK, Petr a Petr URBÁNEK, 2018. *Hepatologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0394-2.

IBRAHIM, Samar H., 2021. Sinusoidal endotheliopathy in nonalcoholic steatohepatitis: therapeutic implications. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. **321**(1), G67–G74. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00009.2021

IGREJA SÁ, Ivone Cristina, Katarina TRIPSKA, Milos HROCH, Radomir HYSPLER, Alena TICHA, Hana LASTUVKOVA, Jolana SCHREIBEROVA, Eva DOLEZELOVA, Samira EISSAZADEH, Barbora VITVEROVA, Iveta NAJMANOVA, Martina VASINOVA, Miguel PERICACHO, Stanislav MICUDA a Petr NACHTIGAL, 2020. Soluble Endoglin as a Potential Biomarker of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Development, Participating in Aggravation of NASH-Related Changes in Mouse Liver. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(23), 9021. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21239021

JAHN, Daniel, Stefan KIRCHER, Heike M. HERMANNNS a Andreas GEIER, 2019. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. **1865**(5), 943–953. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2018.06.023

KABIRAJ, Arpita, Jagriti GUPTA, Tanya KHAITAN a Preeti Tomar BHATTACHARYA, 2015. PRINCIPLE AND TECHNIQUES OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY – A REVIEW. *International Journal of Biological & Medical Research* [online]. **6**(3), 5204–5210 [vid. 2024-02-27]. Dostupné z: <https://www.biomedscidirect.com/journalfiles/IJBMRF20151859/principle-and-techniques-of-immunohistochemistry-a-review.pdf>



KALYUZHNY, Alexander E., 2016. *Immunohistochemistry* [online]. Cham: Springer International Publishing. ISBN 978-3-319-30891-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-30893-7

KASPER, Philipp, Anna MARTIN, Sonja LANG, Fabian KÜTTING, Tobias GOESER, Münevver DEMIR a Hans-Michael STEFFEN, 2021. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clinical Research in Cardiology* [online]. **110**(7), 921–937. ISSN 1861-0684. Dostupné z: doi:10.1007/s00392-020-01709-7

KONG, Deok-Hoon, Young KIM, Mi KIM, Ji JANG a Sukmook LEE, 2018. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(4), 1057. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19041057

LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS, 2020. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(1), 147. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22010147

MARTÍNEK, Jan a Pavel TRUNEČKA, 2021. *Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech*. Jessenius. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-684-9.

MESCHER, L. Anthony, 2018. *Junqueirovy základy histologie*. 4. vyd. B.m.: Galén. ISBN 9788074923241.

MEURER, Steffen K., Lidia TIHAA, Erawan BORKHAM-KAMPHORST a Ralf WEISKIRCHEN, 2011. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling* [online]. **23**(4), 683–699. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2010.12.002

SCHOONDERWOERD, Mark J A, Marie-Jose T H GOUMANS a Lukas J A C HAWINKELS, 2020a. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* [online]. **10**(2). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10020289

SCHOONDERWOERD, Mark J.A., Maaïke F.M. KOOPS, Ricardo A. ANGELA, Bryan KOOLMOES, Melpomeni TOITOU, Madelon PAAUWE, Marieke C. BARNHOORN, Yingmiao LIU, Cornelis F.M. SIER, James C.H. HARDWICK, Andrew B. NIXON, Charles P. THEUER, Marieke F. FRANSEN a Lukas J.A.C. HAWINKELS, 2020b. Targeting Endoglin-Expressing Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment Enhances the Effect of PD1 Checkpoint Inhibitor Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* [online].

**26**(14), 3831–3842. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2889

THEUER, Charles, 2016. Anti-endoglin antibodies and uses thereof [online]. United States, 9926375B2. [vid. 2024-02-24]. 2016. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US9926375B2/en>

TREFTS, Elijah, Maureen GANNON a David H. WASSERMAN, 2017. The liver. *Current Biology* [online]. **27**(21), R1147–R1151. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2017.09.019

TRIPSKA, Katarina, Ivone Cristina IGREJA SÁ, Martina VASINOVA, Matej VICEN, Radim HAVELEK, Samira EISSAZADEH, Zuzana SVOBODOVA, Barbora VITVEROVA, Charles THEUER, Carmelo BERNABEU a Petr NACHTIGAL, 2022. Monoclonal anti-endoglin antibody TRC105 (carotuximab) prevents hypercholesterolemia and hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Frontiers in Medicine* [online]. **9**. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2022.845918

VAN HERCK, Mikhaïl, Luisa VONGHIA a Sven FRANQUE, 2017. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients* [online]. **9**(10), 1072. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9101072

VELLIOU, Rallia-Iliana, Aigli-Ioanna LEGAKI, Polyxeni NIKOLAKOPOULOU, Nikolaos I. VLACHOGIANNIS a Antonios CHATZIGEORGIOU, 2023. Liver endothelial cells in NAFLD and transition to NASH and HCC. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **80**(11), 314. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-023-04966-7

WILHELM, Zdeněk a Mudr Peter HEGYI, 2007. Fyziologie jater. / *Praktické lékařství* [online]. **3**(5) [vid. 2024-02-27]. Dostupné z: [https://www.solen.cz/artkey/lek-200705-0015\\_Fyziologie\\_jater.php](https://www.solen.cz/artkey/lek-200705-0015_Fyziologie_jater.php)

WITTCHEN, Erika, S., 2009. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Frontiers in Bioscience* [online]. **14**(7), 2522. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/3395

YOUNOSSI, Zobair M., Pegah GOLABI, James M. PAIK, Austin HENRY, Catherine VAN DONGEN a Linda HENRY, 2023. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review.

*Hepatology* [online]. **77**(4), 1335–1347. ISSN 0270-9139. Dostupné  
z: doi:10.1097/HEP.0000000000000004