

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Imunohistochemická analýza exprese endoglinu a biomarkerů zánětu během jaterní fibrózy po podávání Carotuximabu

Veronika Šíroková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Mé poděkování patří prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a pomoc při odborném vedení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Vašinové za cenné rady a čas, které mi věnovala v souvislosti s experimentální částí této práce.

„Prohlašuji, že tato diplomová 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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 8. 4. 2022



Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Imunohistochemická analýza exprese endoglinu a biomarkerů zánětu během jaterní fibrózy po podávání Carotuximabu

Autor: Veronika Šíroká

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

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo analyzovat změny exprese endoglinu a markerů zánětu VCAM-1 a ICAM-1 u experimentálního myšího modelu jaterní fibrózy, která byla indukována podáváním diety s obsahem 3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidinu (DDC). Dalším cílem bylo objasnit vliv podávání carotuximabu na expresi těchto markerů po indukci fibrózy a zjistit, zda carotuximab inhibicí endoglinu ovlivňuje proces jaterní fibrózy.

Metody: Experimentální myši byly rozděleny do tří skupin – kontrolní skupina, které bylo podáváno standardní krmivo (chow diet), DDC skupina, které bylo podáváno krmivo obohacené o DDC, a skupina DDC/TRC105, které byl souběžně k DDC dietě podáván carotuximab. Vzorky jaterní tkáně ze všech tří skupin byly podrobeny histochemickému barvení pro průkaz steatózy (světelná mikroskopie) a nepřímé imunohistochemické analýze pro průkaz exprese buněčných adhezních molekul ICAM-1 (fluorescenční mikroskopie), VCAM-1 a endoglinu (světelná mikroskopie). Dále byla provedena imunofluorescenční detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1.

Výsledky: Výsledky této diplomové práce ukazují, že DDC dieta indukovala rozvoj jaterní fibrózy a zánětu, ovšem bez účasti endoglinu, jehož exprese byla u DDC a DDC/TRC105 skupiny oproti kontrolní skupině snižena. Rozvoj zánětu byl u DDC a DDC/TRC105 skupiny potvrzen zvýšenou expresí ICAM-1 v endotelových buňkách a VCAM-1 v cholangiocytech. Kolokalizace endoglinu a VCAM-1 nebyla prokázána. Podávání carotuximabu nemělo vliv na změny exprese endoglinu, ICAM-1 ani VCAM-1.

Závěr: Byl prokázán rozvoj zánětu u DDC a DDC/TRC105 skupiny detekcí exprese zánětlivých markerů ICAM-1 a VCAM-1. Snižování exprese endoglinu v jaterní tkáni zvířat, kterým byl podáván DDC, je pravděpodobně zapříčiněno přímým působením DDC, a to bez ohledu na rozvoj fibrózy. Podávání carotuximabu tedy nemělo vliv na rozvoj fibrózy a expresi

sledovaných markerů, neboť endoglin, cíl působení carotuximabu, byl již snížen samotným podáváním DDC. Použití experimentálního DDC modelu tedy není vhodné pro zkoumání vlivu carotuximabu na rozvoj jaterní fibrózy.

Klíčová slova: carotuximab (TRC105), endoglin, fibróza, ICAM-1, imunohistochemie, nealkoholové ztučnění jater (NAFLD), VCAM-1, zánět

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Title of Diploma Thesis: Immunohistochemical analysis of endoglin expression and biomarkers of inflammation during liver fibrosis after Carotuximab administration

Author: Veronika Šíroková

Supervisor of Diploma Thesis: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: The aim of this diploma thesis was to analyze changes in the expression of endoglin and markers of inflammation VCAM-1 and ICAM-1 in liver in an experimental mouse model of liver fibrosis, which was induced by administration of a diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-collidine (DDC). Another aim was to elucidate the effect of carotuximab administration on the expression of these markers after fibrosis induction, and to determine whether carotuximab administration affects the process of liver fibrosis by endoglin inhibition.

Methods: The experimental mice were divided into three groups – the control group, which was fed a standard (chow) diet, the DDC group, which was fed a DDC-supplemented diet, and the DDC/TRC105 group, which was administered by carotuximab along with the DDC diet. Liver tissue samples from all three groups were subjected to histochemical staining to detect steatosis (light microscopy) and indirect immunohistochemical analysis to detect endoglin, VCAM-1 (light microscopy) and ICAM-1 (fluorescence microscopy) expression. In addition, immunofluorescence detection of endoglin and VCAM-1 colocalization was performed.

Results: The results of this diploma thesis show that the DDC diet induced the development of liver fibrosis and inflammation without the participation of endoglin. Endoglin expression was reduced in the DDC and DDC/TRC105 groups compared to the control group. The development of inflammation was confirmed in the DDC and DDC/TRC105 groups by an increased expression of ICAM-1 in endothelial cells and VCAM-1 in cholangiocytes. Endoglin and VCAM-1 colocalization was not proved. Carotuximab administration did not affect the changes in endoglin, ICAM-1 nor VCAM-1 expression.

Conclusion: The development of inflammation has been demonstrated in the DDC and DDC/TRC105 groups by detecting the expression of the inflammatory markers ICAM-1 and

VCAM-1. The decrease of endoglin expression in the liver tissue of animals treated with DDC is probably due to the direct action of DDC, regardless the development of fibrosis. Thus, carotuximab administration did not affect the development of fibrosis and the expression of the observed markers, as endoglin, the target of carotuximab, was already reduced by DDC administration alone. Therefore, the use of an experimental DDC model is not suitable for investigating the effect of carotuximab in the development of liver fibrosis.

Key words: carotuximab (TRC105), endoglin, ICAM-1, fibrosis, immunohistochemistry, inflammation, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), VCAM-1

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část	11
2.1	Játra.....	11
2.1.1	Histologie jater	11
2.1.2	Funkce jater	14
2.2	Nealkoholové ztučnění jater	15
2.2.1	Jaterní fibróza u NAFLD.....	15
2.2.2	NAFLD a diabetes mellitus 2. typu.....	19
2.3	Endoglin.....	21
2.3.1	Struktura	22
2.3.2	Funkce	23
2.3.3	Úloha endoglinu při poruchách jater (fibróza).....	25
2.4	Buněčné adhezní molekuly a jejich úloha v patologii a fibróze jater.....	28
2.4.1	ICAM-1	30
2.4.2	VCAM-1.....	31
2.5	Zvířecí modely jaterní fibrózy	32
2.5.1	Modely indukované dietou.....	32
2.5.2	Modely indukované toxiny.....	33
2.6	Carotuximab (TRC105).....	36
2.6.1	Struktura	36
2.6.2	Funkce, farmakodynamika	37
2.6.3	Léčba carotuximabem	41
2.7	Imunohistochemie	41
2.7.1	Enzymatická metoda	43
2.7.2	Imunofluorescenční metoda	45
2.7.3	Amplifikační metody.....	45

3	Cíle diplomové práce	47
4	Experimentální část.....	48
4.1	Experimentální zvířata.....	48
4.2	Metodika.....	48
4.2.1	Imunohistochemické protokoly.....	48
5	Výsledky	55
5.1	Reprezentativní snímky histochemického barvení olejovou červení	55
5.2	Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce endoglinu.....	57
5.3	Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce VCAM-1	60
5.4	Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1	64
5.5	Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce ICAM-1	66
6	Diskuze	70
7	Závěr	73
8	Seznam použitých zkratk	74
9	Seznam obrázků	78
10	Použitá literatura	80

1 Úvod

Nealkoholové ztučnění jater (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) je metabolické onemocnění, jehož prevalence stoupá alarmujícím tempem zejména v zemích západního světa [1]. NAFLD pokrývá spektrum chorobných stavů jako je nevýrazná steatóza, nealkoholová steatohepatitida i fibróza. Ačkoli se jedná o onemocnění, které se může vyvinout do velmi závažných stádií včetně cirhózy a hepatocelulárního karcinomu, v současné době neexistuje farmakoterapie cílená na játra, která by uměla zastavit nebo alespoň zpomalit progresi [1] [2]. U pacientů s NAFLD se často současně vyskytuje diabetes mellitus 2. typu (DM2), a tyto dva stavy jsou vzájemně provázány [3]. Při dosažení remise NAFLD úpravou životosprávy a snížením tělesné hmotnosti dochází ke snížení rizika vývoje DM2. Farmakoterapie, která by pozitivně ovlivňovala NAFLD, by tedy mohla být perspektivní i pro prevenci a případně léčbu DM2 [4].

Endoglin je transmembránový glykoprotein, který je součástí receptorového komplexu pro transformující růstový faktor β (TGF- β) [5]. Podílí se na fyziologické funkci cévního endotelu, ale také hraje zásadní roli během různých patologických procesů včetně fibrózy [6]. Konkrétně v játrech endoglin spouští aktivační kaskádu, která vede k profibrogennímu efektu [7].

Intercelulární adhezní molekula ICAM-1 a vaskulární buněčná adhezní molekula VCAM-1 jsou transmembránové proteiny, které patří do nadrodiny imunoglobulinových adhezních molekul. Hrají důležitou roli při zánětlivých procesech a jejich exprese v játrech při zánětlivém poškození stoupá [8].

Carotuximab je chimerická monoklonální protilátka, která blokuje působení endoglinu [9]. Jeho antiangiogenní účinek s protinádorovým potenciálem byl zkoumán v několika experimentálních studiích. Mimo inhibici neoangiogeneze se také zdá být zajímavý jeho vliv na snížení počtu fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblasts, CAF) u experimentálních nádorových modelů [10].

Tato diplomová práce se zaměřuje na imunohistochemickou analýzu exprese endoglinu a markerů zánětu v jaterní tkáni poškozené fibrózou u experimentálního zvířecího modelu, a změnu jejich exprese při souběžném podávání carotuximabu.

2 Teoretická část

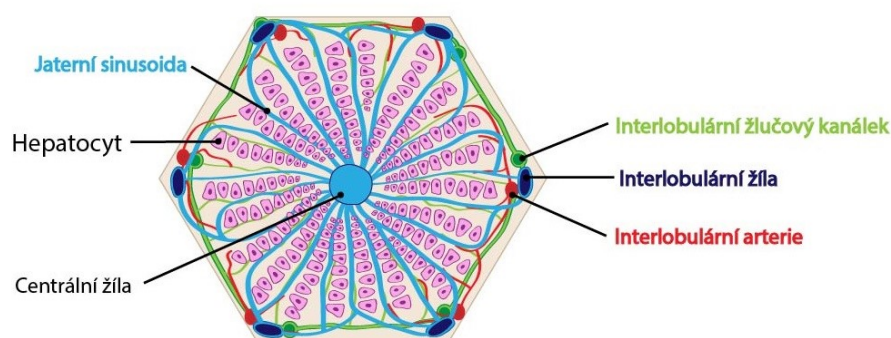
2.1 Játra

Játra jsou druhým největším orgánem lidského těla. Představují přechod mezi trávicím systémem a krví, protože zpracovávají živiny vstřebané trávicím traktem a přetvářejí je na formu využitelnou ostatními orgány. Játra jsou uložena pod bránicí v dutině břišní [11].

2.1.1 Histologie jater

Játra jsou pokryta tenkou vazivovou membránou (*capsula Glissoni*), která je zesílená v oblasti jaterní branky. Jaterní brankou vstupují cévy a nervové pleteně, vystupuje žlučovod. Vazivo z této oblasti se větví, zanořuje se do parenchymu a vytváří jaterní lalůčky (*lobulus venae centralis*), které mají polygonální tvar (viz obrázek 1). Tyto jaterní lalůčky jsou tvořeny jaterními epitelovými buňkami – hepatocyty. Hepatocyty mají jedno až dvě okrouhlá jádra a obsahují velké množství drsného i hladkého endoplazmatického retikula. Hepatocyty jsou uspořádány do trámců a radiálně se sbíhají v jedné až dvou vrstvách do středu lalůčku k centrální véně [11].

Prostor mezi trámci hepatocytů je vyplněn sinusoidami – jaterními kapilárami, které jsou zpevněny retikulárními vlákny. Mezi buňkami endotelu sinusoid a hepatocyty se nachází Disseho prostor. Do tohoto prostoru se vychlípují mikrokilky hepatocytů, které se tak dostávají do těsného kontaktu s krví. Díky tomu je umožněna snadná výměna makromolekul jako například albuminu, fibrinogenu či lipoproteinů. Tento prostor také obsahuje hvězdčicovité Itovy buňky, které uchovávají tuky a skladují exogenní vitamín A ve formě retinyl esterů. Sinusoidy na lumenální straně endotelových buněk obsahují makrofágy – Kupfferovy buňky. V jaterních sinusoidách se nacházejí také Pit buňky – typ NK buněk specifický pro játra, který se vyznačuje výraznou cytotoxickou aktivitou [11] [12]. Vrcholy jaterních lalůček jsou tvořeny portobiliárními prostory, ve kterých jsou portální triády (*trias hepatis*). V portální triádě se nachází interlobulární žíla (větev *vena portae*), interlobulární arterie (větev *arteria hepatica*), interlobulární žlučovod a doprovodné lymfatické cévy [11] [13].

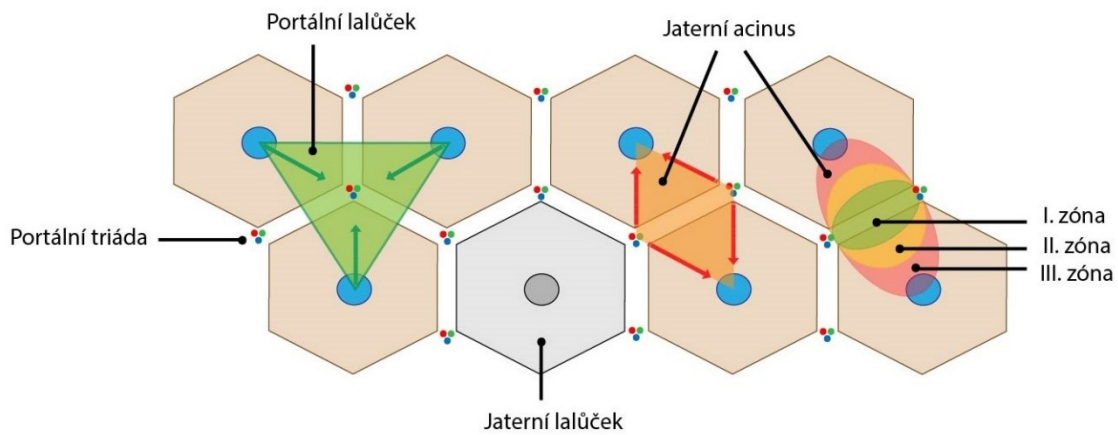


Obrázek 1: Znázornění jaterního lalůčku. Ve středové části jaterního lalůčku se nachází centrální žíla, v portobiliárním prostoru se nachází interlobulární žlučový kanálek, interlobulární žíla a interlobulární arterie. Mezi trámci hepatocytů prochází sinusoidy. Převzato z [13].

Do jater se krev z většiny dostává skrze *vena portae*, která přináší odkysličenou krev se vstřebanými živinami z orgánů dutiny břišní. *Vena portae* je tvořena endotelovými plochými buňkami uspořádanými v jedné vrstvě. Větví se a ústí do portálních triád ve formě portálních venul. Tyto portální venuly, neboli interlobulární vény, se dále rozvětvují na distribuční vény, které se na periferii jaterních lalůčků vlévají do sinusoid [11].

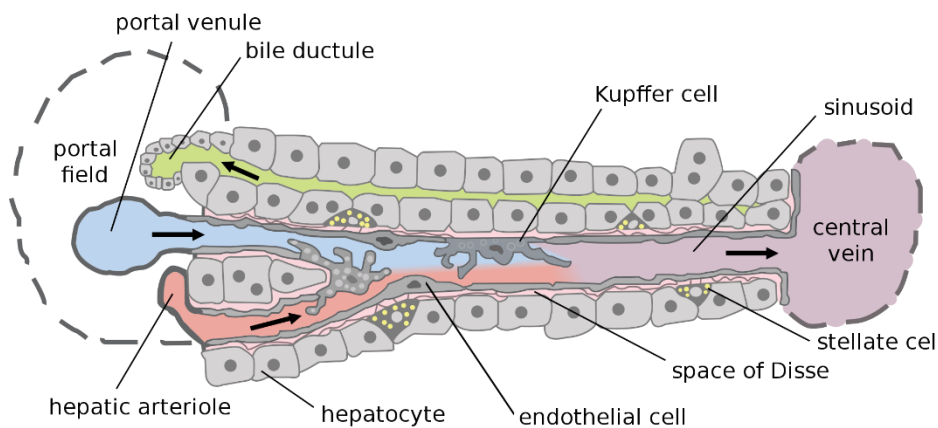
Játra jsou částečně zásobena krví i skrze *arteria hepatica*, která naopak vede z břišní aorty krev okysličenou. *Arteria hepatica* je stejně jako *vena portae* tvořena endotelovými plochými buňkami a také se větví na interlobulární arterie, které nalezneme v portobiliárním prostoru. Některé interlobulární arterie vytváří vstupní arterioly, které končí přímo v jaterních sinusoidách. Krev v sinusoidách je tedy směsí krve venózní i arteriální [11] [13].

Sinusoidy se paprskovitě sbíhají směrem od periferie k centru lalůčku, kde splynou v centrální žílu. Tato centrální žíla má endotelové buňky zpevněné řídkou vrstvou kolagenních vláken. Centrální žíla ústí do sublobulární žíly. Tyto žíly z jednotlivých lalůčků spolu splývají a vytvářejí *venae hepaticae*, které ústí do dolní duté žíly. Kyslík a látky vstřebané ve střevě se tedy nejprve dostanou k periferii a až poté k centrální části lalůčku. Hepatocyty se vzájemně liší strukturálně, histochemicky i biochemicky v závislosti na vzdálenosti umístění od portálních triád. V této souvislosti se používá pojem jaterní acinus, který je znázorněn na obrázku 2 [11] [13].



Obrázek 2: Grafické znázornění tří funkčně-strukturálních jednotek jater. Jaterní acinus je rozdělen do tří zón v závislosti na vzdálenosti od portálních triád. Zóna I je nejlépe zásobena kyslíkem a živinami, zóna III naopak nejméně. Převzato z [13].

V oblasti *vena centralis* se formují žlučové kanálky. Jedná se o vytvořené kanálky těsnými spoji mezi hepatocyty. Tyto kanálky tvoří síť podél ploten hepatocytů, vlévají se do intralobulárních žlučovodů s kubickým epitelem tvořeným cholangiocyty (Heringovy kanály) a vedou do interlobulárních žlučových kanálků v portobiliárních prostorech. Tyto žlučové kanálky postupně sílí v *ductus hepaticus*, který má cylindrický epitel. Směr toku žluči je tedy opačný než směr toku krve [11] [13], jak je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3: Grafické znázornění histologie jaterního lalůčku. Z portobiliární oblasti přitéká krev z *vena portae* a *arteria hepatica* směrem do *vena centralis*. Opačným směrem teče žluč žlučovými kanálky. V sinusoidách se nachází Kupfferovy buňky. V Disseho prostoru se nachází hvězdicovité buňky. Převzato z [14].

2.1.2 Funkce jater

Játra jsou důležitým orgánem, ve kterém dochází k syntéze řady látek, odbourávání xenobiotik, exkreci žluči a metabolismu mnoha substrátů. V játrech jsou tvořeny žlučové kyseliny, cholesterol, lipoproteiny, dochází zde k vychytávání a oxidaci mastných kyselin, lipogenezi (přeměna sacharidů na tuky). Játra představují zásobárnu energetických metabolitů – tuky jsou skladovány ve formě triacylglycerolů, cukry ve formě glykogenu. Dále dochází ke glykogenolýze a glukoneogenezi (přeměna tuků a aminokyselin na glukózu), což má za následek regulaci hladin glukózy. Probíhá zde degradace aminokyselin a tvorba močoviny, která je přenášena krevním řečištěm do ledvin a odtud vylučována močí [11].

V drsném endoplazmatickém retikulu hepatocytů probíhá syntéza většiny bílkovin, které jsou následně játry exportovány dále. Syntéza přibližně 5 % bílkovin probíhá i v Kupfferových buňkách. Mezi tyto bílkoviny řadíme plazmatické proteiny, které udržují onkotický tlak krve (albumin), či hemokoagulační faktory (např. protrombin, fibrinogen). Játra také produkují angiotenzinogen [11]. Dále také udržují zásoby železa, mědi, kobaltu, vitamínu B12 a vitamínu D. Hvězdicovité Itovy buňky skladují vitamín A [15].

Mezi další funkce Kupfferových buněk patří přibližně 10% tvorba erythropoetinu [13], většina erythropoetinu je pak syntetizována v ledvinách. Fagocytující Kupfferovy buňky zabraňují pronikání případných mikroorganismů do systémové cirkulace [15]. Dále tvoří žlučové barvivo bilirubin, jež vzniká převážně rozpadem hemoglobinu. Bilirubin je následně přenášen do hepatocytů. Hepatocyty zachycují, přeměňují a vylučují látky obsažené v krvi do žlučových kanálků. Hladké endoplazmatické retikulum obsahuje enzymy, které zajišťují detoxikaci chemických látek a léků pomocí konjugace, oxidace či methylace. Zde je tedy bilirubin konjugován s kyselinou glukuronovou na sloučeninu rozpustnou ve vodě a poté je ve formě bilirubin-glukuronidu vylučován do žlučových kanálků [11].

Žluč má důležitou funkci v emulzifikaci tuků v trávicím traktu a v jejich následné absorpci. Jedním ze zdrojů žluči jsou primární žlučové kyseliny syntetizované v játrech z cholesterolu – kyselina cholová a chenodeoxycholová [13]. Soli žlučových kyselin jsou vylučovány z hepatocytů do žlučových cest. Těmito cestami se dostanou do žlučníku a z něj do tenkého střeva. Střevní bakterie převádějí některé z těchto primárních solí na sekundární žlučové soli – deoxycholát a lithocholát. Ze střeva se tyto sekundární soli žlučových kyselin z většiny resorbují zpět do krve v portálním oběhu, ale částečně jsou i vyloučeny do stolice. Z portálního oběhu se dostanou opět k hepatocytům, kde se přidají k malému množství žlučových solí syntetizovaných v játrech [15].

Játra detoxikují a vylučují mnoho převážně lipofilních substancí, které se buď tvoří v průběhu metabolismu (např. bilirubin, steroidní hormony), anebo které přicházejí ze střevního traktu. Nejdříve je nutná primární biotransformace těchto hydrofobních látek. V prvním kroku jsou k hydrofobním substancím pomocí enzymů monooxygenáz přidány reaktivní OH, NH₂ nebo COOH skupiny. Ve druhém kroku jsou tyto substance konjugovány s kyselinou glukuronovou, acetátem, glutathionem, glycinem, sulfátem atd. Tyto konjugáty se tak stávají rozpustné ve vodě a mohou být následně zpracovány ledvinami a vyloučeny močí, nebo mohou být vyloučeny do žluči jaterními buňkami a exkretovány stolicí. Cholesterol a triacylglyceroly (TAG) importované ze střev a nově syntetizované v játrech jsou ve formě VLDL exportovány z jater na periferii [16].

2.2 Nealkoholové ztučnění jater

Při dlouhodobé nerovnováze mezi příjmem a výdejem energie, případně při poruchách ukládání lipidů ve formě TAG do zásob tukové tkáně, dochází k ukládání lipidů v orgánech. Pokud se tyto lipidy ukládají v jiných orgánech a tkáních než k tomu určených, mluvíme o ektopické kumulaci tuku [3]. Nealkoholové ztučnění jater (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) je metabolické onemocnění, které je definováno jako ektopická kumulace tuku v játrech u osob, u kterých nebyl prokázán předcházející abúzus alkoholu [17]. Toto onemocnění je silně spojeno s obezitou a diabetem mellitem 2. typu (DM2). NAFLD je nejčastější příčinou jaterního poškození v západním světě, a prevalence tohoto onemocnění celosvětově roste přibližně stejným tempem, jako celosvětová epidemie obezity a DM2 [1]. NAFLD pokrývá spektrum chorobných stavů včetně nevýrazné steatózy, nealkoholové steatohepatitidy (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) a fibrózy, přičemž u některých pacientů může dojít až k cirhóze, hepatocelulárnímu karcinomu a selhání jater. Zejména rozsah jaterní fibrózy tvoří nejdůležitější prognostický znak [2].

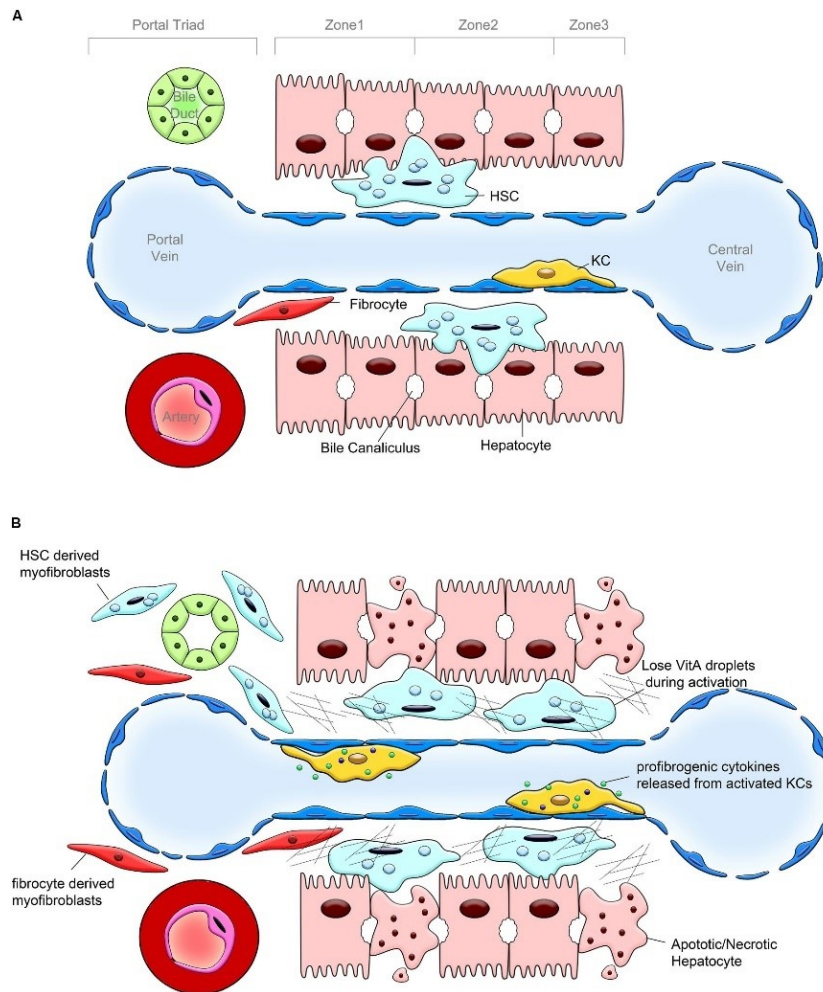
2.2.1 Jaterní fibróza u NAFLD

Fibrotický proces je reparativní reakce tkáně na její poškození. Játra mají výjimečně vysokou schopnost reagovat na poškození reparací. Nicméně, opakované poškození může vyvolat nekontrolovanou opravu vedoucí k nadměrné náhradě zdravého parenchymu jizvou, která omezuje normální funkci tkáně. Profibrotické změny v játrech se vyskytují u většiny chronických jaterních onemocnění, včetně poškození v důsledku infekce patogeny (virus hepatitidy B nebo C, červi rodu *Schistosoma*), některých léků či toxinů (např. paracetamol), alkoholismu, autoimunitních hepatobiliárních onemocnění, metabolických poruch, jako je

přetížení železem nebo mědí (např. Wilsonova choroba), a v neposlední řadě v důsledku výše zmiňovaného nealkoholového ztučnění jater [18] [19].

Fibrogenese začíná poškozením hepatocytů na místě narušeného jaterního parenchymu, nebo poškozením cholangiocyty u cholestatických onemocnění. Toto poškození vede k uvolnění zánětlivých mediátorů, které mají za cíl přitáhnout další buňky imunitního systému, a k aktivaci Kupfferových buněk [19], jak je uvedeno na obrázku 4. Na extravazaci leukocytů do místa poranění se podílejí buněčné adhezí molekuly, viz kapitola 2.4. Jakmile leukocyty imigrují do tkáně, začínají uvolňovat více prozánětlivých a profibrogenních cytokinů, čímž zesilují zánětlivou odpověď. V tomto zánětlivém prostředí se aktivují jaterní hvězdicovité buňky a diferencují se na α SMA-pozitivní myofibroblasty (u žlučových chorob se aktivují také portální fibroblasty – fibroblasty sousedící s epitelem žlučovodu), což je klíčové pro jaterní fibrogenese [20]. Myofibroblasty mají vysoký proliferační, migrační a kontraktilní potenciál a jsou hlavními producenty fibrotické extracelulární matrix, jako jsou vlákna kolagenu typu I a III, elastin, fibronektin, proteoglykany a ostatní [21]. Tyto myofibroblasty progresivně transformují okolní extracelulární matrix na matrix s vysokou hustotou a zvýšenou tuhostí. Současně se snižuje degradace matrix, což vede k akumulaci matrixové sítě a časem k narušení normální tkáňové architektury, orgánové dysfunkci, a nakonec orgánovému selhání, stejně jako k vyšší náchylnosti k rozvoji rakoviny jater [19].

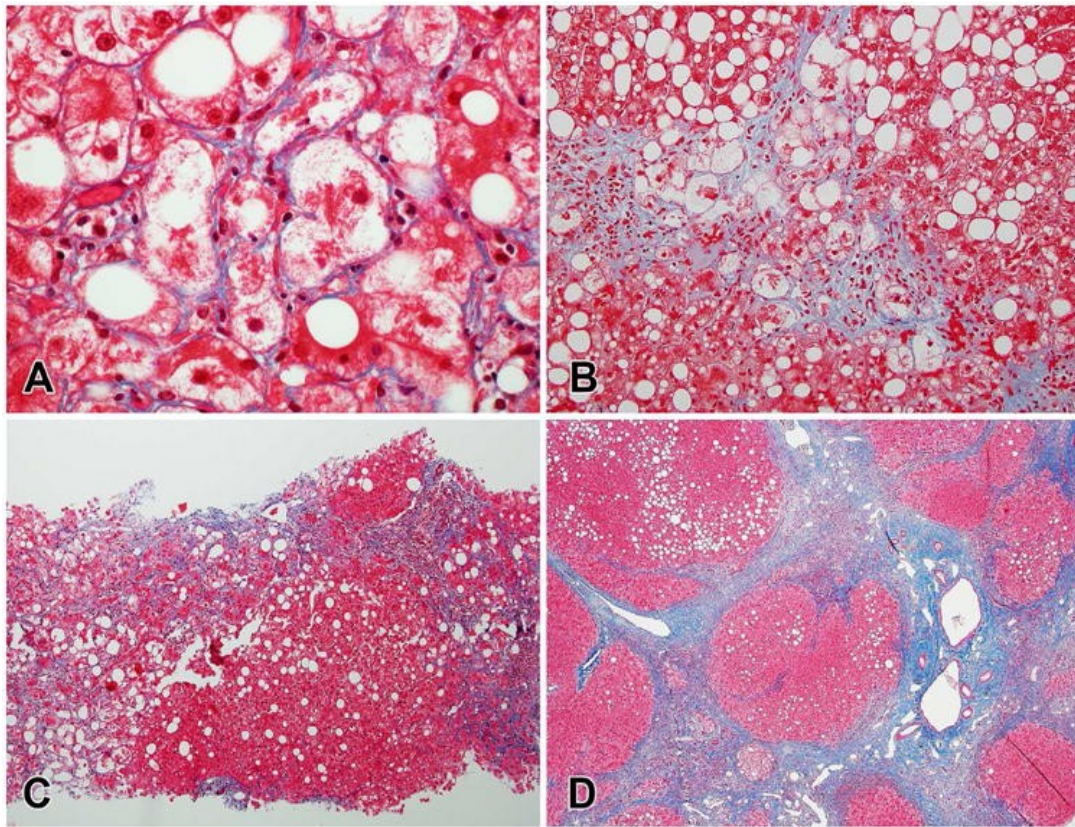
Mezi několik základních fibrogenních drah, které se uplatňují napříč různými onemocněními jater, patří transformující růstový faktor β (transforming growth factor β , TGF- β), růstový faktor pojivové tkáně (connective tissue growth factor, CTGF), oxidační stres, destičkový růstový faktor (platelet derived growth factor, PDGF), vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) a integriny – viz kapitola 2.4. Dráhy více specifické pro NASH a NASH fibrózu zahrnují akumulaci volného cholesterolu, konečné produkty pokročilé glykace, hedgehog signalizaci, Toll-like receptory a aktivaci zánětu [19] [23].



Obrázek 4: Zjednodušené znázornění patogeneze jaterní fibrózy. (A) Jaterní lalůček za fyziologického stavu. Hvězdčité buňky (hepatic stellate cells, HSC) se nachází v Disseho prostoru mezi hepatocyty a endotelem sinusoid, obsahují lipidové kapénky a slouží jako zásobárna vitamínu A. Zdravá tkáň obsahuje jen málo fibrocytů (neaktivní forma vazivové buňky.) (B) Změny v jaterním lalůčku způsobené chronickým poškozením jater. V reakci na chronické poškození podléhají hepatocyty apoptóze a uvolňují faktory, které aktivují Kupfferovy buňky a fibrocyty. Dochází k uvolnění TGF- β 1, který aktivuje hvězdčité buňky na myofibroblasty exprimující kolagen typu I. Převzato z [22].

Oproti jiným etiologiím vykazují pacienti s NAFLD odlišný distribuční vzorec jaterní fibrózy. Na rozdíl od jiných onemocnění jater, kde se fibróza v okolí centrální žíly uplatňuje až v pozdějších stádiích, u NAFLD vzniká fibróza pericentrálně v zóně III zároveň s tvorbou jemné perisinusoidální fibrózy. Dalším charakteristickým znakem je přítomnost lobulární perisinusoidální fibrózy a tenkých kolagenových vláken obklopující hepatocyty s charakteristickým vzorem kuřecího drátu (chicken-wire) [20]. Jak nemoc postupuje, oblast

centrální žíly a portobiliární oblasti je propojována fibrotickými můstky, které značí stádium pokročilé fibrózy. Vrcholným stádiem je spojení portobiliární a centrální oblasti skrze fibrotická septa, čímž dochází k vytvoření uzlů, které izolují ostrůvky jaterního parenchymu [24], viz obrázek 5.



Obrázek 5: Progrese fibrózy u NASH. (A) Časná perisinusoidální fibróza s jemnými kolagenovými vlákny mezi hepatocyty (na snímku je patrná jejich balónová degradace) ve vzoru kuřecího drátu v zóně III (zvětšení 600x). (B) Pokročilá perisinusoidální fibróza (200x). (C) Přemostující fibróza s rozsáhlými sítěmi perisinusoidální fibrózy téměř obklopující regenerativní uzel (100x). (D) Cirhóza (40x). Převzato z [24].

Složení jaterní extracelulární matrix (ECM) se během fibrogenese výrazně mění a komponenty ECM přímo přispívají k remodelačnímu procesu komunikací s okolními buňkami. Kolagen tvoří hlavní část fibrotické ECM, přičemž kolagen typu I je nejhojnější složkou. Obecně je mírná fibróza charakterizována počátečním zvýšením kolagenu typu I a III, které se dále zvyšují během progrese fibrózy. Při pokročilé fibróze a cirhóze jsou zvýšeny další složky ECM, jako např. kolagen typu V, VI, X a XVIII, elastin, fibronektin a laminin, zatímco kolagen typu XII může být snížen [25].

Chronický zánět a fibróza jater jsou doprovázeny poškozením krevních cév, což vede k dysregulaci průtoku krve a dynamickému vzestupu portálního tlaku. Normální jaterní mikrovaskulatura se skládá z plně diferencovaných sinusoidálních endotelových buněk, které obsahují transmembránové póry zvané fenestrace. Díky fenestracím je umožněna transvaskulární výměna. Během fibrogenese se sinusoidální endotelové buňky dediferencují a ztrácejí své fenestrace, tento proces bývá označován jako kapilarizace. To vede ke snížení difuze kyslíku do parenchymu a ke zvýšenému pokrytí těchto cév hvězdovitými buňkami, které fungují jako nástěnné buňky a mají kontraktilní funkci. Díky této kontrakci dochází ke zmenšení průměru sinusoidy [26].

Dále také fibrotická extracelulární matrix stlačuje portální a centrální žílu, což vede ke zvýšenému odporu vůči průtoku krve a tím ke snížené dodávce kyslíku. To vše má za následek hypoxii a uvolnění hypoxií indukovatelných proangiogenních faktorů, které stimulují neovaskularizaci. Nové cévy podporují zánět a fibrózu, protože nabízejí více ukotvujících míst pro migrující leukocyty [26]. Angiogeneze a fibróza se tedy vyvíjejí paralelně a blokování angiogeneze v několika experimentálních modelech vedlo ke snížení jaterní fibrózy [27].

2.2.2 NAFLD a diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus je chronické onemocnění charakterizované hyperglykemií v důsledku akutního nedostatku inzulínu (DM1) nebo relativního nedostatku inzulínu (DM2). Dále rozlišujeme gestační diabetes mellitus, MODY (maturity-onset diabetes of the young), LADA (latent autoimmune diabetes of adults) a prediabetes. DM1 je podmíněn destrukcí B-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu autoimunitním procesem. Do této kategorie můžeme zařadit i LADA diabetes. MODY diabetes je geneticky podmíněný – autozomálně dominantní dědičnost [28]. Prediabetes je stav, pro který je typická poškozená glukozová tolerance a inzulínová rezistence (snížená schopnost tkáně reagovat na inzulín), a je zde riziko progresu. Diabetický stav se také může vyvinout při onemocněních pankreatu (chronická pankreatitida) [29], nebo může být iatrogeně navozený (glukokortikoidy, atypická antipsychotika, thiazidová diuretika). Pro DM2 je charakteristická inzulínová rezistence, většinou v důsledku obezity a nedostatku pohybu, případně genetiky, a dále se objevuje porucha sekrece inzulínu. DM2 tvoří přibližně 80-90 % celkového zastoupení a je typický spíše pro pacienty nad 40 let, kteří trpí obezitou. Klinický obraz zahrnuje hyperglykémii, glykosurii, polyurii, žízeň a dehydrataci, která může vést až ke ketoacidóze a kómatu. Dále se objevuje svalová slabost, únava, úbytek na váze. Mezi chronické komplikace neléčeného diabetu patří mikroangiopatie – poškození malých cévek (zejména u DM1) zahrnující retinopatii, nefropatii

a neuropatii. U DM2 se častěji rozvíjí makroangiopatie (postižení velkých cév), kam patří aterosklerotické komplikace, kardiomyopatie, ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin a cévní mozková příhoda. U obou typů nekompensovaného DM se také často objevují kožní a slizniční záněty [30].

Obezita a inzulinová rezistence jsou klíčovými patogenními faktory pro NAFLD i DM2. Tyto dva patologické stavy se běžně vyskytují současně a tím zvyšují riziko nežádoucích hepatálních a extrahepatálních klinických dopadů [31]. DM2 je také jedním z nejsilnějších rizikových faktorů pro rychlejší progresi NAFLD do nealkoholové steatohepatitidy, pokročilé fibrózy, cirhózy nebo hepatocelulárního karcinomu. Naopak NAFLD je spojeno s přibližně dvojnásobně vyšším rizikem rozvoje DM2, bez ohledu na obezitu a další běžné metabolické rizikové faktory. Toto riziko koresponduje se závažností NAFLD, takže pacienti s pokročilejšími stádii jaterní fibrózy mají zvýšené riziko výskytu DM2 [4] [32]. Úprava životního stylu (včetně nízkokalorické diety a fyzické aktivity) vede k významnému zlepšení jaterní steatózy, poškození jater a fibrózy u jedinců s NAFLD [33], a je také vysoce účinná v prevenci nebo oddálení nástupu DM2 u lidí s vysokým rizikem jeho rozvoje [34]. Zlepšení stavu NAFLD (detekovatelné na ultrasonografii) je zároveň spojeno se snížením rizika DM2, což naznačuje, že léčba zaměřená na játra by mohla snížit riziko rozvoje DM2 [4].

U NAFLD je nejčastější abnormalitou plazmatických lipidů aterogenní dyslipidémie, která je typicky charakterizována zvýšenými hladinami VLDL a LDL částicemi a sníženými hladinami HDL cholesterolu [31]. Ke zvýšení rizika vzniku DM2 u NAFLD pravděpodobně dochází jak v časně fázi akumulace lipidů v játrech, tak v pozdní fázi charakterizované zánětem jater a fibrózou. Konkrétní faktory NAFLD, které zvyšují riziko vzniku DM2, však nejsou zcela jasné. Mezi některé možné mechanismy patří například faktory spojené se zvýšenou akumulací jaterních lipidů, která je spojena s inzulinovou rezistencí jater, tukové tkáně a svalů, a také se zánětem. Na akumulaci jaterních lipidů má vliv složení stravy (příjem nasycených tuků), změny střevní mikroflóry a faktory spojené s funkcí střev (například metabolismus žlučových kyselin, hladiny lipopolysacharidů a inkretinů nebo změněná střevní permeabilita). Další předpokládané mechanismy zahrnují funkci tukové tkáně ovlivňující de novo syntézu ceramidů, citlivost na inzulin a jaterní metabolismus glukózy [3] [4] [35].

Klíčová funkce sekundárních žlučových kyselin je zprostředkována jejich schopností interagovat s různými jadernými receptory ve střevě, včetně FXR (farnesoid X receptor, receptor žlučových kyselin) a TGR5 (receptor žlučových kyselin spřažený s G-proteinem). Tyto dva receptory jsou důležité pro regulaci procesů souvisejících s metabolismem glukózy

a lipidů. Zatímco TGR5 je exprimován pouze v tenkém střevě, FXR je exprimován i v játrech, a to jak v hepatocytech, tak v jaterních hvězdicových buňkách [36]. V tenkém střevě jsou FXR a TGR5 exprimovány v endokrinních L-buňkách [4].

Aktivace TGR5 v enterocytech zvyšuje uvolňování glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1) z L-buněk. Sekrece GLP-1 zvyšuje sekreci inzulínu z pankreatických B-buněk, a ten následně ovlivní koncentraci glukózy v plazmě [4]. Inzulín je degradován jak játry (50-80 % z celkové clearance inzulínu), tak jinými tkáněmi. Játra jsou tedy schopna ovlivňovat hladinu cirkulujícího inzulínu. Clearance inzulínu je u pacientů s NAFLD snižena [17].

Aktivace jaterních FXR receptorů snižuje syntézu mastných kyselin a triglyceridů, což vede ke snižující se akumulaci lipidů v játrech. Navíc aktivace FXR také snižuje jaterní glukoneogenezi, zvyšuje syntézu jaterního glykogenu a aktivuje TGR5, čímž vede ke zvýšení sekrece inzulínu [37]. U pacientů s NAFLD je exprese jaterního FXR snižena, což má za následek zvýšení jaterní syntézy TAG a následnou jaterní steatózu [36]. Tyto účinky naznačují, že aktivace FXR a TGR5 by mohla představovat terapeutickou strategii nejen pro snížení obsahu lipidů v játrech, ale také pro snížení hladin glukózy v plazmě a pro potenciální snížení zvýšeného rizika vzniku DM2 vyvolaného NAFLD [4].

NAFLD je často spojena se zvýšeným denním příjmem celkových kalorií (včetně zvýšeného příjmu nasycených tuků ve stravě) a také s dysfunkcí tukové tkáně. Ta je charakterizovaná inzulínovou rezistencí a nadměrnou lipolýzou. Souhrnně tato situace vede k dodávání zbytků chylomikronů a neesterifikovaných mastných kyselin do jater za účelem podpory lipogeneze nezávislé na inzulínu. To má za následek zvýšenou akumulaci TAG v játrech a zvýšenou jaterní glukoneogenezi. Zvýšená dostupnost jaterních lipidů společně s nedostatečnou adaptací mitochondriálních funkcí může vyvolat produkci diacylglycerolů (DAG) a ceramidů, které negativně přispívají jak k jaterní inzulínové rezistenci, tak k progresi NAFLD [4] [38].

2.3 Endoglin

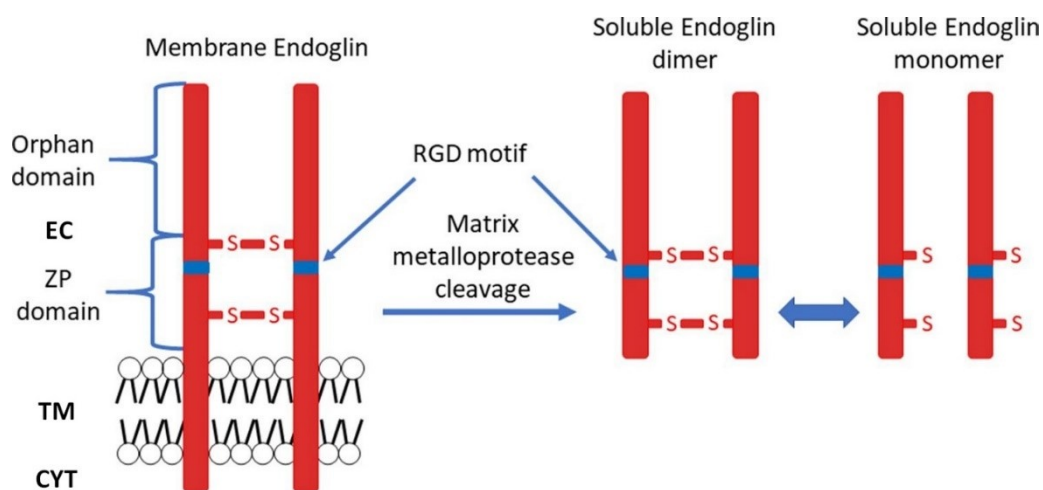
Součástí membránového receptorového komplexu TGF- β je glykoprotein s označením CD105 – endoglin [5]. Tento glykoprotein o velikosti 180 kDa se vyskytuje ve dvou izoformách a reguluje signální aktivitu TGF- β [18]. Je exprimován v menší míře na klidových endotelových buňkách, zatímco v místech aktivní angiogeneze je na těchto buňkách exprimován ve zvýšené míře (nádor, zánětlivá tkáň, hojení ran, embryogeneze). Stejně tak je exprese endoglinu nízká na normálních buňkách hladkého svalstva, ale v buňkách cévního

hladkého svalstva v oblasti aterosklerotických plátů dochází k up-regulaci [39]. Endoglin je dále exprimován na monocytech, makrofázích [40], jaterních hvězdčovitých buňkách [41] a fibroblastech, a jeho exprese se ve tkáních procházejících fibrotickým procesem zvyšuje [39] [42]. Změny v jeho expresi a funkci jsou pozorovány u některých patologických stavů, jako je rakovina, neoangiogeneze, fibróza [6] [43], endotelová dysfunkce [44], či zánět [45].

2.3.1 Struktura

Struktura endoglinu je složena ze dvou transmembránových monomerů, které jsou vzájemně spojeny dvěma disulfidickými můstky. Rozlišujeme tři strukturální části – extracelulární, transmembránovou a cytoplazmatickou část (viz obrázek 6). Extracelulární část se skládá z 561 aminokyselin a obsahuje orphan doménu a doménu zona pellucida (ZP). Tato ZP doména je zodpovědná za interakci protein-protein a její součástí je sekvence Arg-Gly-Asp (RGD), což je základní rozpoznávací struktura pro vazbu integrinů a adhezních molekul [39] [46]. S touto sekvencí se kromě lidského endoglinu setkáme také u orangutaního endoglinu, ale nikoli u jiných druhů zvířat. Orphan doména je zodpovědná za vazbu ligandů. Název dostala dle toho, že nevykazuje podobnost s žádnou jinou rodinou proteinů či domén [39]. Další části endoglinu jsou hydrofobní transmembránová část tvořená 25 aminokyselinami a krátká cytoplazmatická část, která je bohatá na serin a threonin [46]. Struktura dvou vyskytujících se izoform endoglinu je odlišná v počtu aminokyselin v této cytoplazmatické části, a dále se liší v afinitě k receptorům ALK-1 (activin receptor-like kinase), ke kterým má vyšší afinitu L-endoglin (long), zatímco k ALK-5 má vyšší afinitu S-endoglin (short) [47]. L-endoglin je nejhojněji exprimovanou izoformou. Jeho cytoplazmatická část obsahuje 47 aminokyselin. Druhá, minoritně exprimovaná izoforma S-endoglin má cytoplazmatickou část složenou pouze ze 14 aminokyselin [39] [47]. Pro účely této práce považujeme endoglin za synonymum pro jeho L-izoformu, pokud nebude uvedeno jinak.

Extracelulární část endoglinu může být štěpena tzv. matrix metaloproteinázami (MMP), konkrétně MMP-12 a MMP-14 [48]. Tímto vzniká N-koncový produkt tohoto štěpení – solubilní forma endoglinu (sEng). Tento sEng se může vyskytovat ve formě dimeru i monomeru. Obě tyto formy se uvolňují do krevního oběhu, kde mohou být detekovány [39] [48]. Detekce sEng může být využita jako biomarker u pacientů s kardiovaskulárními a metabolickými poruchami [49] [51].



Obrázek 6: Struktura endoglinu. Membránový endoglin je dimer spojený dvěma disulfidickými můstky. Dělí se na cytoplazmatickou (CYT), transmembránovou (TM) a extracelulární oblast (EC). Tato extracelulární oblast obsahuje orphan doménu a ZP doménu, jejíž součástí je RGD sekvence. Po rozštěpení extracelulární části matrixovou metaloproteinázou vzniká solubilní endoglin, který je možné detekovat v cirkulaci. Převzato z [49], upraveno.

2.3.2 Funkce

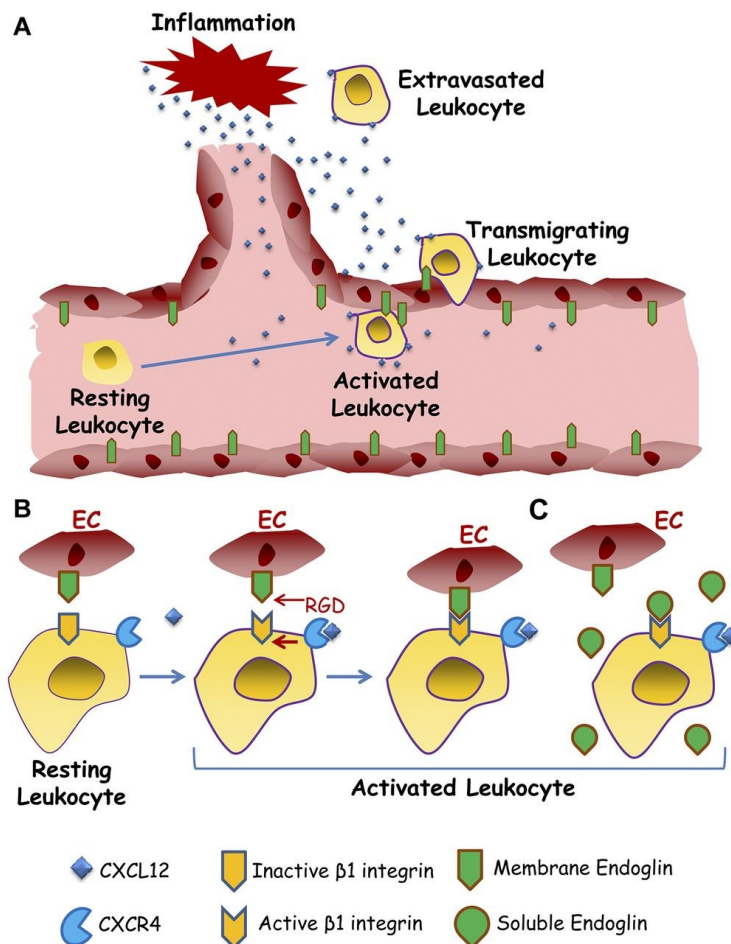
Endoglin se podílí na fyziologické funkci cévního endotelu, ale také hraje zásadní roli během různých patologických procesů, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, endotelová dysfunkce [44], rakovina, angiogeneze [39] či fibróza [6].

TGF- β je multifunkční cytokin, který má vliv na buněčnou proliferaci, diferenciaci a produkci extracelulární matrix [18]. Endoglin je zapojen do modulace odpovědi TGF- β receptorového komplexu po navázání ligandů ze superrodiny TGF- β , jako jsou například TGF- β 1, TGF- β 3, Activin-A, BMP-2, BMP-7 a BMP-9 (bone morphogenic protein) [39] [50]. Tento receptorový komplex se skládá ze dvou podjednotek, T β RI a T β RII, přičemž existují dva druhy T β RI (ALK-1 a ALK-5). S-endoglin se skrze signalizaci zprostředkovanou T β RII – ALK-5 – SMAD2/3 účastní indukce transkripce genů souvisejících s fenotypem klidové endotelové buňky – inhibuje migraci a proliferaci. L-endoglin naopak tuto signalizaci inhibuje a podílí se na transkripci genů souvisejících s fenotypem aktivovaných endotelových buněk skrze aktivaci dráhy T β RII – ALK-1 – SMAD1/5/8. Stimuluje tedy jejich migraci, proliferaci, podílí se na angiogenezi a stává se tak důležitým faktorem v růstu tumorů. [39] [47] [52]. Nadměrná exprese endoglinu v cévách endotelu u solidních tumorů je úzce spjata se špatnou prognózou

a přítomností metastáz [43]. Bližší informace o roli endoglinu v procesu angiogeneze jsou uvedeny v kapitole 2.6.2.

Kromě TGF- β signalizace má endoglin i další funkce. Je zapojen do organizace cytoskeletu a tím ovlivňuje morfologii buněk a jejich migraci [53]. Mutace endoglinu souvisí s rozvojem hereditární hemoragické teleangiektázie (HHT), což je onemocnění projevující se častým krvácením z nosu a krevními výrony na kůži i na vnitřních orgánech [54]. Endotelová syntáza oxidu dusnatého (eNOS) je klíčový enzym udržující správnou funkci cévního endotelu. Důsledkem snížené aktivity eNOS při patologických stavech, jako je hypercholesterolémie či zánět, může vzniknout endotelová dysfunkce. Byla prokázána souvislost mezi tímto enzymem a endoglinem – snížení membránového endoglinu, a naopak zvýšení hladin sEng v plazmě jsou známkou rozvoje endotelové dysfunkce [44]. Exprese endoglinu také hraje důležitou roli v transmigraci leukocytů při akutním zánětu, protože další funkcí endoglinu je zprostředkování vazby endotelových buněk k integrinům a dalším receptorům. Při snížené expresi dochází k narušení transmigrace leukocytů a fagocytózy [45], viz obrázek 7. Během studie probíhající na endoglin-deficitních myších byla také prokázána zvýšená permeabilita endotelu a výrazně oslabená schopnost endotelových buněk vzdorovat pronikání nádorových buněk. Z tohoto zjištění vyplývá důležitost endoglinu pro správnou bariérovou funkci endotelu [55].

sEng je cirkulující biomarker patologií a symptomů souvisejících s metabolickým syndromem, včetně hypercholesterolémie, hyperglykémie, arteriální hypertenze a poškození jater [49]. Plazmatická koncentrace sEng byla zvýšená také u pacientů s pokročilým DM a jeho koncentrace pozitivně koreluje se závažností diabetických vaskulárních změn, jako je například retinopatie [51]. Detekce sEng v cirkulaci je biomarkerem preeklampsie [56] a sEng má také prozánětlivý potenciál [49].



Obrázek 7: Role endotelového endoglinu při extravazaci leukocytů. (A) Při zánětlivých podmínkách jsou uvolněny prozánětlivé mediátory (představeno chemkinem CXCL12), což vede k aktivaci a endoglin-dependentní extravazaci leukocytů. (B) Proces transmigrace leukocytů zahrnuje vazbu CXCL12 na receptor CXCR4, který následně aktivuje $\beta 1$ -integriny. Po aktivaci se $\beta 1$ -integrin naváže na RGD oblast endoglinu na povrchu endotelových buněk (EC), což umožňuje extravazaci a migraci leukocytů do místa zánětu. (C) Solubilní endoglin soutěží s membránovým endoglinem o vazbu na leukocytární $\beta 1$ -integrin, čímž brání adhezi a transmigraci leukocytů. Převzato z [45].

2.3.3 Úloha endoglinu při poruchách jater (fibróza)

TGF- $\beta 1$ představuje důležitý profibrogenní faktor a jeho nadměrná signalizace se podílí na řadě fibrotických stavů v různých orgánech. V procesu fibrogenese má několik rolí – přímo aktivuje jaterní hvězdicovité buňky, stimuluje produkci ECM a zabraňuje degradaci ECM skrze syntézu tkáňových inhibitorů metaloproteináz [57].

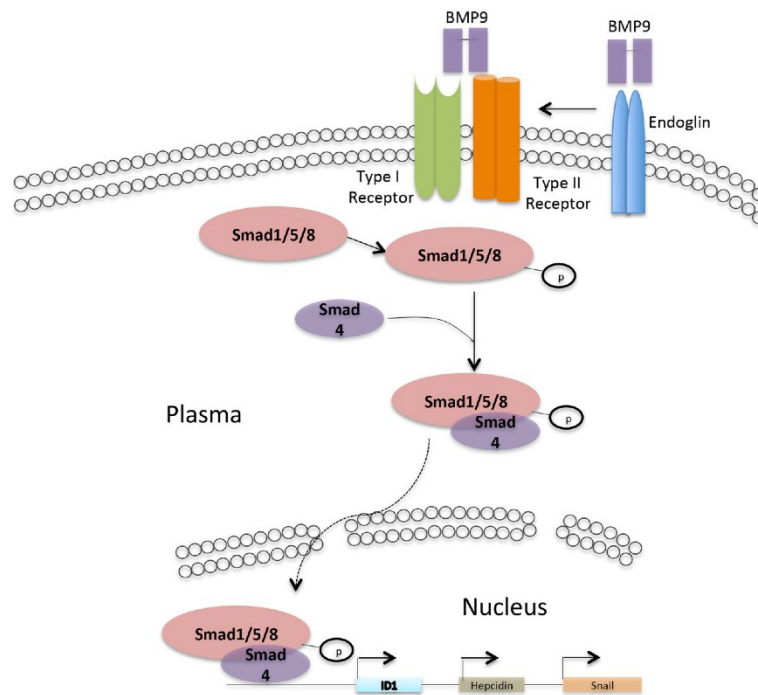
BMP-9 je jeden z ligandů TGF- β receptorového komplexu. S vysokou afinitou se váže také přímo na endoglin a na ALK-1 a tím spouští kaskádu SMAD1/5/8 [50], jak je ukázáno na obrázku 8.

Endoglin je během procesu jaterní fibrózy exprimován na proliferujících vaskulárních a sinusoidálních endotelových buňkách, sklerodermických fibroblastech, Kupfferových buňkách, hvězdicovitých buňkách (které jsou nejvíce profibrogenním buněčným typem v játrech) a hladkosvalových buňkách cév. L-izoforma je exprimována primárně, S-izoforma je exprimována také, ale v menší míře [6] [54] [57].

Obě izoformy endoglinu jsou up-regulovány u jaterního poškození. Zatímco u chronického poškození (NASH) se zvyšuje exprese L-endoglinu, u akutního poškození se zvyšuje i exprese S-endoglinu oproti zdravým kontrolám. Krátce po poškození jater (například podvázání žlučovodu nebo podávání tetrachlormethanu CCl_4) vzrůstá exprese S-endoglinu. Po dvou až třech týdnech je exprese obou izoform zvýšena ve stejné míře [6].

Endoglin hraje důležitou roli v jaterní fibrogenezi tím, že moduluje rovnováhu mezi signalizační kaskádou TGF- β 1 nebo BMP-9 – ALK1 – SMAD1/5/8 a TGF- β 1 – ALK5 – SMAD2/3, přičemž signalizaci ALK-5 inhibuje a ALK-1 naopak zesiluje, a tím reguluje expresi proteinů extracelulární matrix [6] [39] [54]. Nicméně, v závislosti na typu buňky a buněčném prostředí může endoglin modulovat TGF- β signalizaci rozdílným způsobem, a má tak různý vliv na proliferaci, migraci buněk a produkci extracelulární matrix [52]. Navíc různé studie ohledně regulace těchto drah uvádějí rozporuplné závěry. Obecně vzato, v závislosti na typu buňky a koncentraci TGF- β 1 může být cesta ALK1 – SMAD1/5/8 jak profibrogenní, tak i antifibrogenní. V játrech je tato dráha profibrogenní [7].

Syntéza proteinů extracelulární matrix probíhá skrze hvězdicovité buňky cestou ALK-5 – SMAD2/3 [57]. Při poškození jater se ale hvězdicovité buňky aktivují, významně v nich vzroste exprese endoglinu a dojde ke změně cesty z ALK-5 na ALK-1 [6]. Jejich aktivace tedy probíhá cestou TGF- β 1 – ALK-1 – SMAD1 – Id 1 (inhibitor of differentiation 1) s následnou transdiferenciací na myofibroblasty, které produkují proteiny extracelulární matrix a vedou k jaterní fibróze [7].



Obrázek 8: BMP-9 signální dráha. BMP-9 se s vysokou afinitou může vázat přímo na endoglin nebo na $T\beta RI$ (ALK-1), a tím spouští fosforylaci SMAD1/5/8. Po navázání na SMAD4 se tento komplex translokuje do jádra a reguluje genovou expresi cílových genů. *Id 1* vede k transdiferenciaci jaterních hvězdicovitých buněk na myofibroblasty. Heparin inhibuje absorpci železa a jaterní fibróza tak může být doprovázená depozity železa. Snail je regulátorem procesu přechodu mezi epitelem a mezenchymem, jehož inhibice přispívá k down-regulaci profibrogenních faktorů jako je kolagen typu I nebo růstový faktor pojivové tkáně. Převzato z [50].

Na modelu endoglin-deficitních myší se ovšem ukázalo, že delecce endoglinu ve hvězdicovitých buňkách vede k poškození jater a k vyššímu ukládání kolagenu v důsledku zvýšené exprese profibrogenních faktorů jako je αSMA a fibronectin. Endoglin by tedy mohl mít protektivní vliv na vývoj fibrózy a chránit játra před fibrotickým poškozením modulací TGF- β signalizační kaskády [6].

Některé studie uvádí zvýšené hladiny sEng v oběhu během jaterní fibrózy, což vede k domněnce, že během jaterní fibrózy může dojít ke zvýšené expresi endoglinu a následnému uvolnění jeho extracelulární domény z jaterních buněk [58].

Modulace TGF- $\beta 1$ nebo BMP-9 signalizace by tedy mohla být možností, jak terapeuticky ovlivnit jaterní fibrózu [50].

2.4 Buněčné adhezní molekuly a jejich úloha v patologii a fibróze jater

Buněčné adhezní molekuly (cell adhesion molecules, CAM) umožňují interakci buněk s jinými buňkami nebo s extracelulární matrix, což ovlivňuje širokou škálu procesů jako je diferenciace, tkáňová organizace a remodelace, zánět, regenerace, angiogeneze, přežití buněk či maligní transformace. Některé CAM se ukázaly jako významné pro proces chronického zánětu a fibrózy jater. Účastní se mnoha interakcí, které mohou podporovat fibrogenzi uvolňováním profibrogenního TGF- β , nebo zprostředkováním migrace buněk imunitního systému do poškozené jaterní tkáně [19].

CAM se obecně dělí do čtyř hlavních skupin: selektiny, integriny, kadheriny a členy imunoglobulinové nadrodiny CAM – IgCAM [59] [60] [61].

Kromě signalizace vyvolané adhezí mohou CAM zprostředkovat i signalizaci nezávislou na adhezí, a to díky jejich interakci s receptory růstového faktoru, transkripčními faktory nebo jinými signálními proteiny [60].

Při zánětlivých procesech v játrech makrofágy detekují poškození a začnou uvolňovat prozánětlivé mediátory, které přitahují další buňky imunitního systému. Migrace leukocytů z cévního lumen do místa poškození zahrnuje zapojení všech hlavních skupin buněčných adhezních molekul [59]. Leukocyty mohou vstoupit do jater velkými cévami, jako je portální žíla nebo centrální žíla, které jsou obě vystlány vaskulárními endotelovými buňkami, nebo se do jater mohou dostat skrze úzké sinusoidy sestávající ze sinusoidálních endotelových buněk [19].

Migrace leukocytů z cévy do poškozené tkáně probíhá v několika krocích. Nejdříve dochází k vazodilataci, díky které se zpomalí krevní průtok a leukocyty aktivované chemokiny tak mají lepší kontakt s endotelem kapilár. Na vnitřní stěně kapilár jsou přítomné buněčné adhezní molekuly selektiny [19]. Skupina selektinů zahrnuje tři členy, L-, E- a P-selektin, což jsou na vápníku závislé buněčné adhezní molekuly exprimované na endotelových buňkách, leukocytech a krevních destičkách. Leukocyty se díky interakci s nimi začnou rolovat po vnitřní stěně kapiláry podél vaskulárních endotelových buněk. Tento krok umožňuje leukocytům interagovat s chemokiny navázanými na endotel, což má za následek aktivaci leukocytárních integrinů [19].

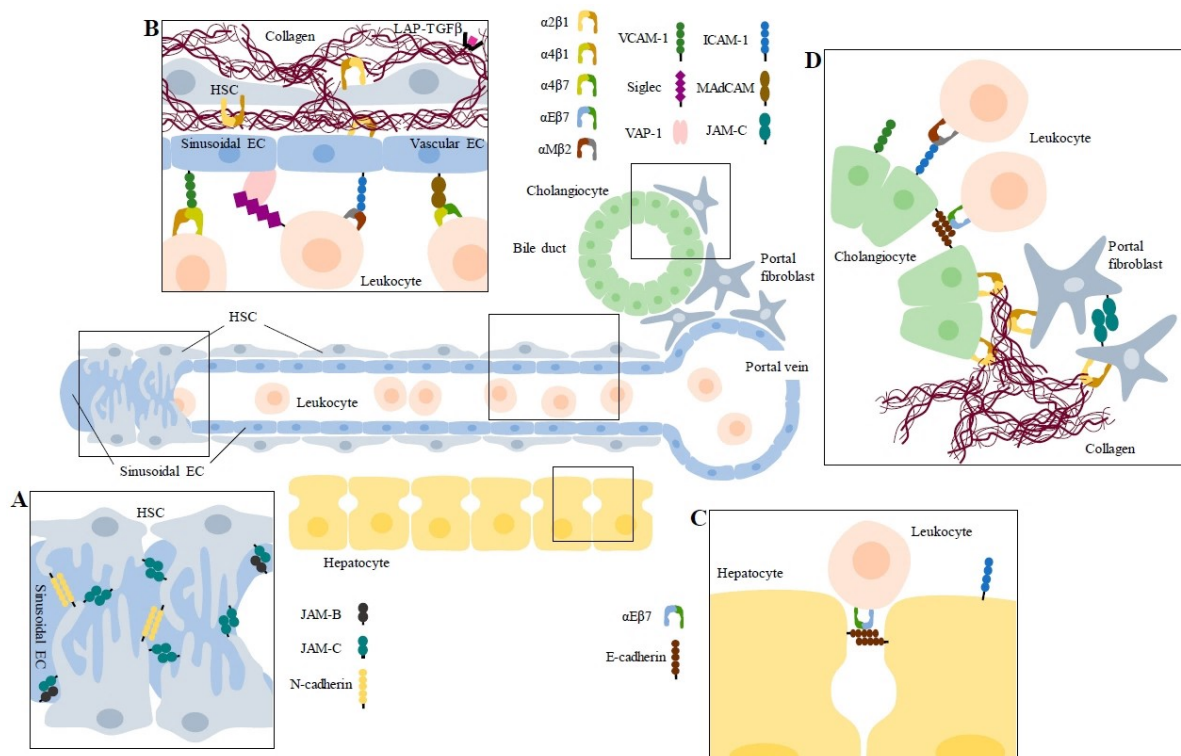
Integriny jsou heterodimerní glykoproteiny skládající se z α - a β -řetězce. Jak ukazuje obrázek 9, tyto buněčné povrchové receptory hrají roli například při migraci leukocytů do poškozené tkáně a umožňují jejich adhezí s endotelovými adhezními receptory, které patří do

rodiny IgCAM. Existuje několik podskupin integrinů, které mají rozličné funkce. Například některé α V-integriny mohou přímo urychlit fibrózu aktivací hvězdicovitých buněk a diferenciací portálních fibroblastů prostřednictvím uvolňování aktivního TGF- β a podporou angiogeneze [19].

Po tom, co leukocyty přestanou rolovat a pevně přilnou k endotelu, dojde za pomoci dalších CAM k vlastnímu průniku leukocytů. Leukocyty buď za podpory kadherinů a IgCAM proniknou spoji mezi endotelovými buňkami (paracelulární cesta), nebo procházejí skrze tělo endotelové buňky (transcelulární cesta), což je opět podporované IgCAM. Pak procházejí bazální membránou, a nakonec vstupují do zanícené tkáně. Leukocyty se poté vážou na cílové buňky a vykonávají cytotoxické reakce. Endotelové a epitelové buňky podporují tyto procesy up-regulací exprese CAM a sekrecí zánětlivých mediátorů [59] [60].

Kadheriny jsou rodinou na vápníku závislých transmembránových proteinů [61]. V klidových hvězdicovitých buňkách je exprimován E-kadherin, ale jeho exprese u hvězdicovitých buněk diferencovaných na myofibroblasty je přeměněna na expresi N-kadherinu. Při nadměrné expresi E-kadherinu je aktivace hvězdicovitých buněk blokována, což naznačuje jeho antifibrotický potenciál [19] [62].

Migrace leukocytů do jater postižených zánětem není závislá pouze na aktivaci leukocytů uvolněnými chemokiny, ale je dále posílena up-regulací hladin CAM. Exprese mnoha CAM je v zánětlivém prostředí stimulována různými mediátory, jako jsou např. IFN- γ (interferon γ), TNF- α (tumor necrosis factor α) nebo IL-1 β (interleukin 1 β) [19]. Jak již bylo uvedeno v kapitole o endoglinu, klíčovým regulátorem tkáňové fibrózy je TGF- β , který existuje ve třech izoformách s překrývajícími se funkcemi. Každá izoforma je syntetizována jako prekurzorový protein, který se proteolyticky štěpí a tvoří neaktivní formu s LAP (latency-associated peptide). Tato neaktivní forma, nazývaná také jako malý latentní komplex, je spojena s proteinem ukotveným k extracelulární matrix, a tím je TGF- β uchovávan extracelulárně v neaktivní formě (viz obrázek 9 B). Isoformy TGF- β 1 a TGF- β 3 obsahují RGD sekvenci a mohou se uvolňovat a aktivovat prostřednictvím konformačních změn latentního komplexu, které jsou indukovány RGD-vazebnými integriny. Uvolňování TGF- β je usnadněno zvýšením tuhosti extracelulární matrix (s vyšším podílem kolagenu, tedy fibrózní ECM) [63]. TGF- β zase aktivuje diferenciaci hvězdicovitých buněk na myofibroblasty, které následně syntetizují více fibrózní ECM, čímž je udržován cyklus tkáňové fibrózy. Integriny, které spouštějí aktivaci TGF- β , tedy mohou podpořit chronické poškození jater zvýšením počtu myofibroblastů a fibrotické ECM [19].



Obrázek 9: Přehled interakcí mezi hepatocyty a CAM během zánětu a fibrózy v jaterní sinusoidě. (A) Céva je pokryta aktivovanými hvězdicovitými buňkami, které mají funkci nástěnných buněk. Mezi sebou spolu interagují skrze N-kadherin a JAM-C, s endotelovými buňkami interagují skrze JAM-B a JAM-C. (B) Hvězdicovité buňky jsou hlavními producenty fibrotické ECM. K této ECM je připoután komplex TGF- β s LAP. Leukocyty se přes integriny vážou na IgCAM, VAP-1 nebo MAdCAM-1 a následně přecházejí skrze endotel a interagují s hepatocyty, viz (C). (D) Při poškození žlučových cest se aktivují také portální fibroblasty, které produkují ECM a vážou se k sobě navzájem skrze JAM-C. Leukocyty se také mohou vázat na cholangiocyty. Převzato z [19].

Nadrodina IgCAM nezávislých na vápníku představuje jednu z největších a nejrozmanitějších rodin proteinů. Jak vyplývá z názvu, všichni členové IgCAM obsahují minimálně jeden imunoglobulin nebo imunoglobulinu podobnou doménu v jejich extracelulární části. Většina IgCAM jsou transmembránové proteiny, ale některé jsou spojeny s buněčným povrchem glykofosfatidylinositolovým ukotvením [60]. Pro účely této diplomové práce jsou podstatné zejména ICAM-1 a VCAM-1.

2.4.1 ICAM-1

Intercelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1, CD54) je transmembránový glykoprotein, který se nachází na endotelových buňkách, fibroblastech, keratinocytech a leukocytech. Poškození jater spouští jeho zvýšenou expresi [8]. Jedná se o hlavní ligand pro některé

β 2-integriny, který umožňuje pevnou adhezi leukocytů a také transcelulární, případně paracelulární migraci [59]. Vzhledem k této funkci je jeho zvýšená exprese spojena se zánětlivými a autoimunitními onemocněními. ICAM-1 je také exprimován v mnoha typech nádorů [8]. Při studii na potkanech, kterým byl podvázán žlučovod, byla pozorována interakce mezi hvězdicovitými buňkami a T-buňkami zprostředkovaná skrze ICAM-1, která vedla k diferenciaci těchto hvězdicovitých buněk, přičemž exprese samotného ICAM-1 na aktivovaných hvězdicovitých buňkách byla zvýšená [19] [64].

2.4.2 VCAM-1

Vaskulární buněčné adhezní molekuly (VCAM) jsou přítomny hlavně na endotelových, ale také na epitelových buňkách a jsou hlavními ligandy pro některé β 1-integriny. Podobně jako ICAM podporují pevnou adhezi leukocytů a transcelulární nebo paracelulární migraci. Expresi VCAM-1 (CD106) ve zdravých játrech je mírná, ale stejně jako u ICAM-1 dochází k indukci exprese při působení zánětlivých cytokinů [8]. U myšího modelu poškození žlučových cest adheze T-buněk na cholangiocyty zprostředkovaná skrze VCAM-1 snižovala apoptózu, a tím tedy podporovala přežití T-buněk a pokračování zánětu jater. Protože IFN- γ a TNF- α mohou vyvolat expresi VCAM-1 na cholangiocytech *in vitro*, samotné T-buňky mohou prodloužit své vlastní přežití sekrecí těchto prozánětlivých mediátorů [65]. Expresi VCAM-1 je spojena s některými autoimunitními onemocněními včetně revmatoidní artritidy a astma. Stejně jako ICAM-1 se i VCAM-1 podílí na rozvoji rakoviny [8].

Do imunoglobulinové rodiny adhezních molekul řadíme i některé další molekuly, které mají vliv na proces zánětu a fibrózy v játrech. Adhezní molekula krevních destiček a endotelových buněk PECAM-1 stejně jako VCAM-1 a ICAM-1 umožňuje leukocytární paracelulární a transcelulární migraci, zároveň však má i protizánětlivé vlastnosti [66]. Adhezní molekula nervových buněk NCAM je ve zdravých játrech exprimována pouze na nervových vláknech v portobiliárním traktu. Při poškození jater se objevuje exprese i na cholangiocytech a myofibroblastech [67]. Junkční adhezní molekuly JAM jsou přítomny na endotelových a epitelových buňkách, krevních destičkách a leukocytech. Regulují paracelulární permeabilitu, buněčnou adhezi a transmigraci leukocytů [59], a při poškození jater stoupá jejich exprese na myofibroblastech, cholangiocytech a infiltrovaných leukocytech [68].

Neklasické adhezní molekuly zahrnují vaskulární adhezní protein 1 VAP-1, který je exprimován na adipocytech, buňkách hladkého svalstva a endotelových buňkách. Při poškození jater se zvyšuje jeho exprese na myofibroblastech. Mukozální adresinová buněčná adhezní molekula 1 MAdCAM-1 je ve zdravých játrech exprimována pouze minoritně, ale při

poškození jater vzrůstá exprese na vaskulárních endotelových buňkách v portobiliárním traktu. Poškození jater dále vede k expresi stabilinu 1 na vaskulárních a sinusoidálních endotelových buňkách, který má potenciál zvýšit počet protizánětlivých regulačních T-buněk v místech chronického zánětu [19].

2.5 Zvířecí modely jaterní fibrózy

Pro lepší pochopení a řešení případných terapeutických strategií je nezbytné využívat *in vivo* model, který rekapituluje patologické rysy onemocnění. Nedostatek zvířecích modelů, které adekvátně napodobují etiologii, patogenezi a histologické rysy NAFLD u lidí je hlavní bariérou, která brání objasnění mechanismů onemocnění a vývoji léků [20].

NAFLD a úzce související metabolické poruchy (např. obezita a DM2) jsou nutriční onemocnění. Proto by se indukce NAFLD či NASH v preklinických modelech měla v ideálním případě spoléhat spíše na lidskou stravu, která vede k podobným metabolickým poruchám, než na suprafyziologické či naopak nedostatečné hladiny živin nebo toxiny, které nejsou pro lidskou etiologii relevantní. Ve výzkumu NASH převažují myší a krysí modely, avšak několik dalších zvířecích druhů se ukázalo jako perspektivní [20].

Mimo níže zmíněné modely jaterní fibrózy se také mohou uplatit genetické modely, které se vzhledem k nutričnímu původu onemocnění pokoušejí zrcadlit metabolický kontext NASH a zahrnují pouze myší modely obezity řízené hyperfágií. Mezi tyto genetické modely patří například modely s deficitem leptinu a leptinových receptorů, mutace v *Alms1* či *Agouti* genu, nebo modely s deficitem receptoru melanokortinu 4 [20].

2.5.1 Modely indukované dietou

Dietou indukované modely aplikují širokou škálu dietních režimů od střídavého obsahu a zdrojů tuku, až po různé množství cholesterolu a dalších složek stravy, které podporují fibrózu.

Diety s vysokým obsahem tuku

Diety s vysokým obsahem tuku (high-fat diets, HFD) obsahují až 70 % kalorií z tuku. HFD často vedou k obezitě a inzulínové rezistenci. Nicméně, vývoj NAFLD u laboratorních zvířat vyžaduje dlouhodobé krmení (fibróza u myší se objevuje po 50 týdnech, u potkanů rychleji) a stav je obvykle méně závažný než u lidí. Tyto modely odrážejí pouze nejranější fáze NASH, a k vyvolání pokročilejší fibrózy jsou zapotřebí další nutriční spouštěče [69].

Diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu

Koncentrace cholesterolu a volného cholesterolu koreluje s jaterní fibrózou. Při podávání přibližně 0,5 % cholesterolu ve stravě po dobu 30 týdnů společně s HFD je ve studiích patrný jasný vliv na rozvoj jaterní fibrózy [70].

Západní diety

Tyto tzv. „Western type diets“ se pokoušejí napodobit nezdravé stravovací návyky lidí tím, že obsahující směs tuku, cukru a cholesterolu, případně vodu slazenou cukrem, která je ekvivalentní komerčním nealkoholickým nápojům. Dietou indukovaný zvířecí model nealkoholového ztučnění jater (DIAMOND) je slibný pro studium mechanismů onemocnění a intervenčních strategií, ačkoli období krmení potřebné k dosažení pokročilé fibrózy je dlouhé [71]. V tomto modelu se mohou uplatnit myši, morčata, a patrně i křečci. Jako větší zvířecí modely jsou využívána prasata Ossabaw či Göttingenská miniprasata. Limitací ovšem je, že anatomie prasečích jater se významně liší od jater lidských [20].

Diety s nedostatkem methioninu a cholinu

Methionin a cholin-deficientní (MCD) dieta indukuje steatohepatitidu a fibrózu omezením klíčových procesů degradace lipidů v játrech (β -oxidace a produkce VLDL částic). Následkem toho dochází ke kumulaci lipidů a poškození jater [69]. Tato dieta v porovnání s předchozími rychleji indukuje steatohepatitidu a pokročilou fibrózu, avšak nevýhodou je výrazný úbytek hmotnosti experimentálních zvířat [72].

Diety s nedostatkem cholinu, doplněné L-aminokyselinami

Stejně jako MCD, cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná (CDAA) dieta je charakteristická nedostatkem cholinu. Kromě toho jsou bílkoviny substituované ekvivalentní směsí L-aminokyselin. Dieta CDAA zachycuje několik aspektů NASH, včetně progresu pokročilé fibrózy a nepřítomnosti úbytku hmotnosti, což je výhoda oproti MCD [69]. Dietu CDAA lze také kombinovat s HFD. V tom případě je na rozdíl od samotné CDAA patrné zvýšení ALT a AST u myši krmených po dobu 6 týdnů [73]. Nicméně, tento nutriční nedostatek je vzdálený od lidské NASH etiologie.

2.5.2 Modely indukované toxiny

Tetrachlormethan, thioacetamid

Klasické modely jaterní fibrózy zahrnují podání tetrachlormethanu (CCl_4) nebo thioacetamidu (TAA), které jsou schopné rychle a silně vyvolat pokročilou fibrózu a cirhózu.

Avšak zejména při samostatném použití tato akutní toxicitou indukovaná jaterní fibróza není relevantním modelem NASH, protože zcela chybí nutriční a metabolická souvislost.

Podávání CCL₄ v kombinaci se západní dietou vyvolává histopatologické a transkriptomické změny podobné těm u lidského NASH [74], nicméně rozdíl v etiologii onemocnění je podstatný a limitující.

Streptozotocin

Protože NAFLD je velmi časté u pacientů s DM [1], některé modely se pokoušejí napodobit hyperglykémii spojenou s onemocněním tím, že poškodí pankreatické B-buňky podáváním toxického analogu glukózy – streptozotocinu [75]. Streptozotocin však může být přímo toxický pro játra, takže je otázka, zda pozorovaný účinek na jaterní fibrózu je zprostředkovaný navozenou hyperglykemií, nebo spíše přímou jaterní toxicitou [72].

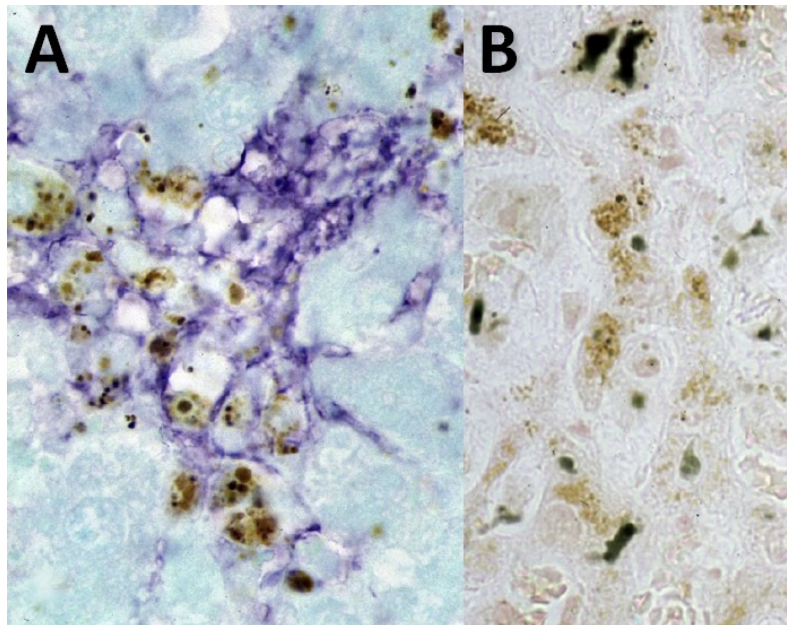
DDC

Dieta obohacená o jaterní toxin 3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidin (DDC, struktura viz obrázek 11) je častým modelem pro výzkum patologických stavů souvisejících s chronickým cholestatickým poškozením jater, u kterých také dochází k rozvoji fibrózy. Tento model byl také použit v této diplomové práci. Podávání 0,1% DDC diety po dobu alespoň 4 týdnů prokazuje patologický nález specifický pro onemocnění s výskytem Malloryho tělísek [76]. Tato tělíška se objevují u patologických stavů souvisejících s cholestázou, alkoholovým poškozením jater a nealkoholovou steatohepatitidou [24]. Podávání DDC vyvolává akumulaci hepatotoxických protoporfyrinů současně s tvorbou protoporfyrinových zátek a kumulací porfyrinových pigmentů. Akumulace protoporfyrinu může u experimentálních zvířat způsobit hepatocelulární poškození a neoplazii. Tyto látky vytvářejí histologický obraz charakterizovaný přítomností červenohnědých pigmentových globulí ve žlučových kanálcích a malých granulích v hepatocytech, Kupfferových buňkách a makrofázích (viz obrázek 10 A). To může být doprovázeno akutním nebo chronickým zánětem portobiliárního prostoru, proliferací žlučovodů a aktivací hvězdicovitých buněk s následnou produkcí fibrózy. Porfyrinový pigment může být zaměněn za žlučový pigment v řezech tkání, který se hromadí podobným způsobem (viz obrázek 10 B). Na rozdíl od žluči se porfyrinové pigmenty vyznačují dvojlomnými vlastnostmi a červenou autofluorescencí v ultrafialovém světle. Předpokládá se, že tento typ porfyrie vyvolaný DDC je výsledkem inhibice enzymu ferrochelatázy v jaterních mitochondriích. Tento enzym katalyzuje zabudování železa do protoporfyrinu IX a je tak konečným krokem v syntéze hemu. Kompenzačním mechanismem inhibice ferrochelatázy je

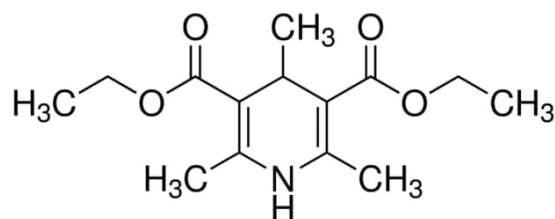
aktivace 5-aminolevulinát syntázy s následnou masivní akumulací substrátu protoporphyrinu [76] [77].

Porfyrinové zátky vyvolávají obstrukci v malých žlučovodech, což způsobuje cholestázu. Kromě toho je pro cholestázu indukovanou DDC typická sklerotizující cholangitida a výrazná biliární fibróza doprovázená duktulární proliferací. Atypická proliferace žlučovodů je stimulem jaterních progenitorů, které se pak diferencují jak na cholangiocyty, tak na hepatocyty, a to za účelem reparace jater [76]. Tato reorganizace žlučnickové architektury je doprovázená zvýšením prozánětlivých (MCP-1, TNF- α , CXCL1 a CXCL5) a profibrogenních cytokinů (PDGF a TGF- β), což vede jak k infiltraci neutrofilů, tak k proliferaci a aktivaci jaterních hvězdicovitých buněk a fibroblastů vedoucí k rozvoji biliární fibrózy v portobiliárním prostoru [78].

Doba podávání DDC je obvykle od 1 do 6 týdnů v závislosti na tom, jaká úroveň cholangiopatie je pro danou studii vyžadována. Játra od prvního týdne podávání DDC vykazují změny v portobiliárním prostoru, a zhruba po 4 týdnech je vidět intraduktulární depozice porfyrinových krystalů a fibróza. Tyto morfologické změny jsou doprovázeny kontinuálním stoupaním hladin ALT a výrazným nárůstem markeru cholestatického poškození – alkalické fosfatázy [78].



Obrázek 10: Porovnání vzhledu porfyrinového a žlučového pigmentu. (A) Fialovou barvou jsou označeny aktivované hvězdicovité buňky produkující α SMA, hnědá barva znázorňuje porfyrinový pigment (400x). (B) Zobrazení žlučového pigmentu ve žlučových kanálcích, zřetelné jsou žlučové zátky i cytoplazmatický lipofuscinový pigment (425x). Převzato z [77], upraveno.



Obrázek 11: Struktura DDC. 3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidin, IUPAC název je diethyl-2,4,6-trimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dikarboxylát. Převzato z [79].

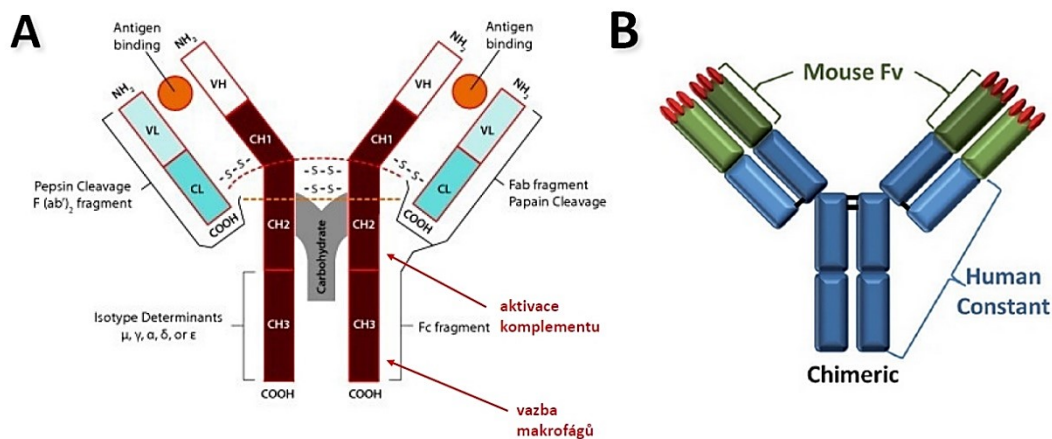
2.6 Carotuximab (TRC105)

Carotuximab, který se také označuje názvem TRC105, je chimerická IgG1 monoklonální protilátka, která se váže na endoglin (CD105, odtud tedy zkratka pro carotuximab) a blokuje jeho působení [9]. S nižší afinitou se také váže na endoglin u myši [80].

2.6.1 Struktura

Monoklonální protilátky jsou imunoglobuliny, které pocházejí z produkce jednoho klonu aktivovaných B-lymfocytů po styku s jedním konkrétním antigenem. Hlavní indikace jejich využití jsou nádorová, zánětlivá, autoimunitní, kardiovaskulární nebo hematologická onemocnění, přičemž v současné době intenzivně probíhá vývoj a řada klinických studií. Obecná struktura monoklonálních protilátek se skládá ze čtyř polypeptidických řetězců – ze dvou identických krátkých (lehkých, light) a dvou identických dlouhých (těžkých, heavy). Tyto řetězce jsou rozdělené na variabilní podjednotky (VL = variable light, VH = variable heavy), které jsou zodpovědné za vazbu na cíl, a na konstantní (signální) podjednotky (CL = constant light, CH = constant heavy), které zodpovídají za aktivaci imunitní odpovědi. Fc oblast obsahuje proteinové sekvence společné všem Ig, ale také determinanty jedinečné pro jednotlivé třídy. Fab oblast zahrnuje lehký i těžký řetězec. Struktura Ig se dále skládá ze sacharidové části, která se taktéž podílí na aktivaci imunitní odpovědi. Disulfidické můstky spojují podjednotky i řetězce. Na variabilních koncích se nacházejí volné aminoskupiny, a na konstantních koncích se nacházejí volné karboxylové skupiny [81]. Grafické znázornění struktury je uvedeno na obrázku 12.

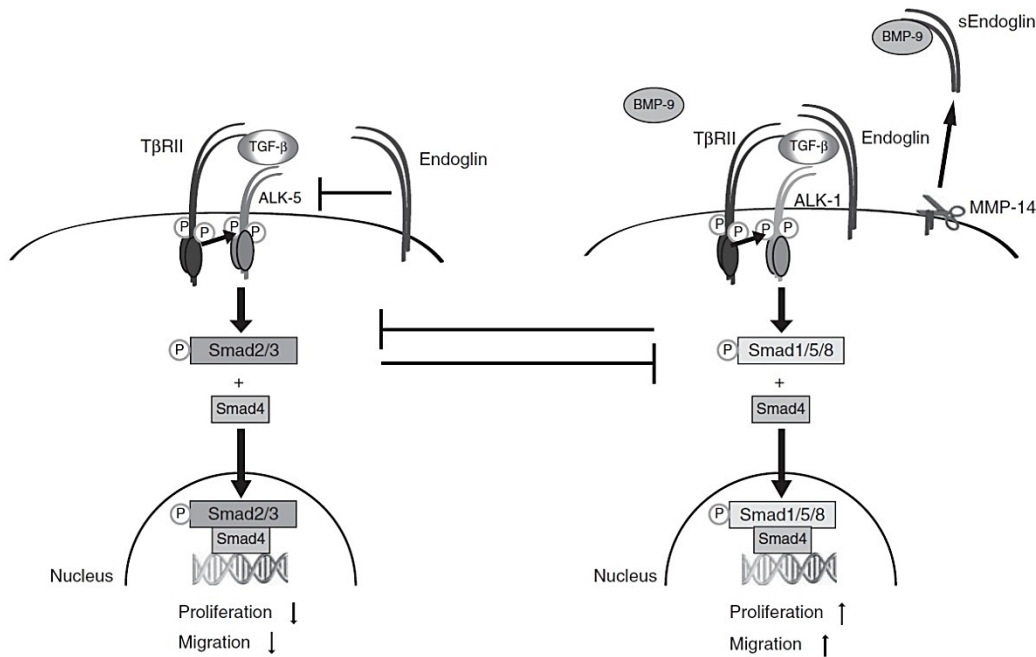
Názvosloví monoklonálních protilátek se skládá z prefixu (caro), cíle (tu – od anglického tumor = nádor), zdroje (xi = chimerický), a suffixu (mab).



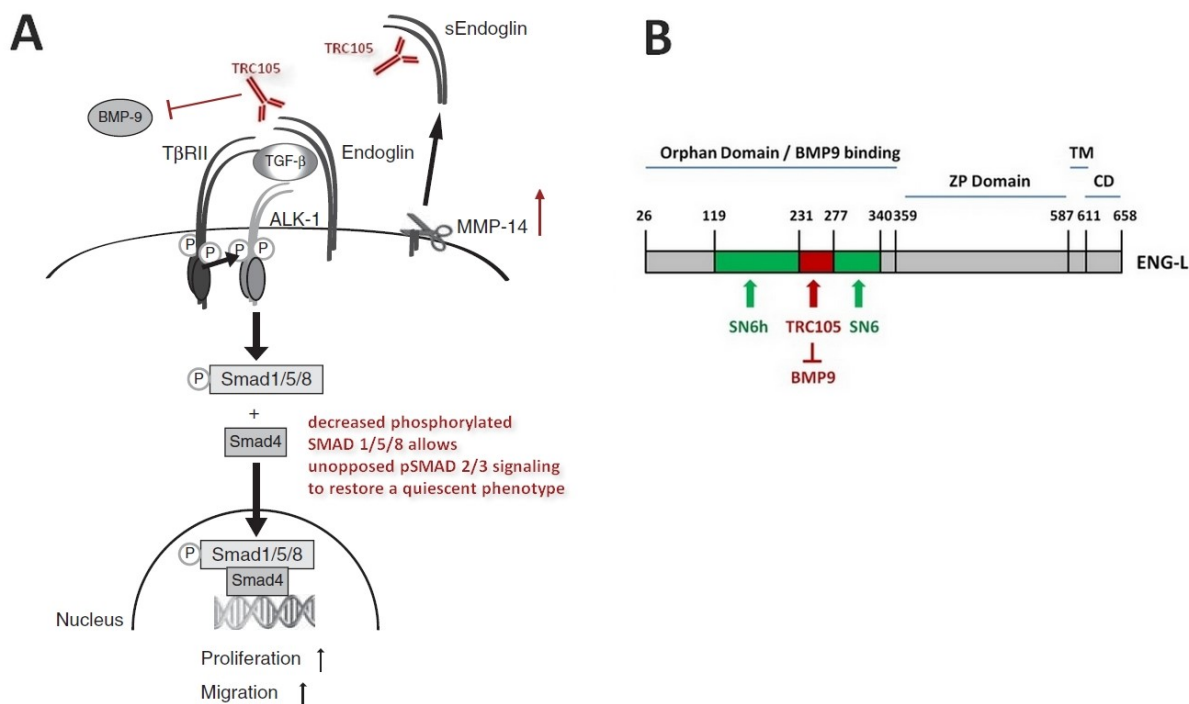
Obrázek 12: Grafické znázornění struktury monoklonální protilátky. (A) Variabilní podjednotky (VL – světle modrá, VH – bílá) jsou zodpovědné za vazbu na cíl (antigen), konstantní podjednotky (CL – tmavě modrá, CH – tmavě červená) jsou zodpovědné za aktivaci imunitní odpovědi. Řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. (B) Chimerická monoklonální protilátka se skládá z konstantních podjednotek lidského původu a variabilních podjednotek myšního původu. Převzato z [81], upraveno.

2.6.2 Funkce, farmakodynamika

Doposud bylo popsáno pět možných mechanismů účinku carotuximabu. Růst primárního nádoru je závislý na kyslíku, živinách a růstových faktorech, které jsou dodávány prostřednictvím angiogeneze. Krevní cévy spojené s nádorem navíc umožňují rakovinným buňkám rozšiřování do vzdálenějších orgánů [80]. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.3.2, a jak shrnuje obrázek 13, endoglin zprostředkovává signalizaci BMP-9 a TGF- β 1 a stimuluje angiogenezi přímo skrze aktivaci cesty ALK-1 – SMAD1/5/8 a nepřímo skrze inhibici signalizace ALK-5 – SMAD2/3 [39] [82]. Carotuximab tuto proangiogenní signalizaci blokuje díky kompetitivní inhibici aktivačního endoglinového ligandu BMP-9 [9], viz obrázek 14.



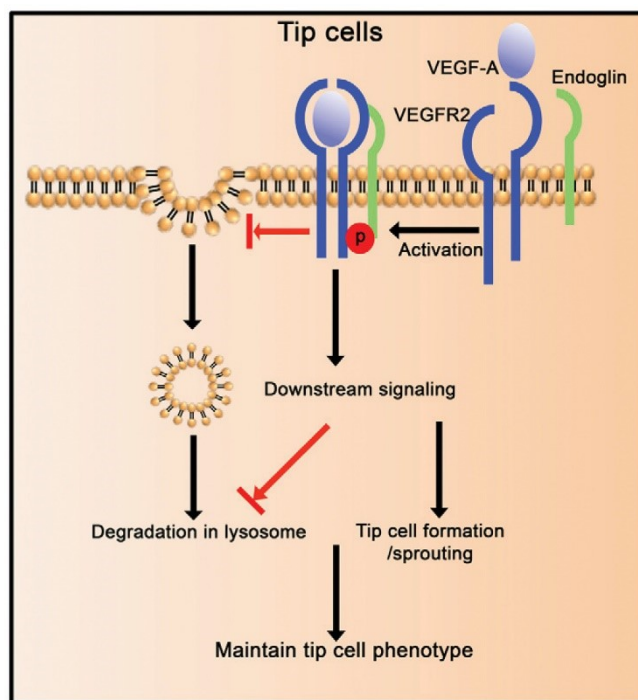
Obrázek 13: TGF- β signální kaskáda v endotelových buňkách. TGF- β se váže na receptor T β RII a skrze transfosforylaci ALK-5 dojde k fosforylaci SMAD2/3. Aktivovaný SMAD2/3 tvoří komplex se SMAD4, který se translokuje do jádra a změnou transkripce cílových genů snižuje proliferaci a migraci endotelových buněk. V přítomnosti endoglinu je TGF- β – ALK-5 signální kaskáda inhibována a probíhá signalizace skrze ALK-1 vedoucí k fosforylaci SMAD1/5/8. BMP-9 se může vázat přímo na endoglin a vyvolává také SMAD1/5/8 fosforylaci. Následný komplex se SMAD4 se translokuje do jádra, kde dochází k proangiogenním transkripčním změnám. Endoglin může být odštěpen působením MMP-14 z buněčné membrány, čímž se sníží hladina membránového endoglinu a vzroste hladina solubilního endoglinu, který může fungovat jako lapač ligandu BMP-9 a tím snižovat následnou signalizaci. Převzato z [82].



Obrázek 14: Carotuximabem inhibovaná vazba BMP-9 na endoglin. (A) TRC105 (carotuximab) blokuje vazbu BMP-9 na endoglin a tím inhibuje signální kaskádu BMP-9 – SMAD1/5/8, zatímco cesta ALK-5 – SMAD2/3 indukovaná skrze TGF- β je nezměněná. Vazba carotuximabu také indukuje uvolňování endoglinu zprostředkované MMP-14. Převzato z [82], upraveno. (B) Znárodná struktura L-endoglinu s čísly aminokyselin zobrazující orphan doménu, ZP doménu, transmembránovou doménu (TM) a cytoplazmatickou doménu (CD). Červeně zvýrazněná oblast orphan domény je místem vazby carotuximabu. Vazba BMP-9 je tak kompetitivně inhibována. Převzato z [9], upraveno.

V procesu angiogeneze má klíčovou roli také vaskulární endotelový růstový faktor VEGF-A a jeho receptor VEGFR-2 [83]. Druhý mechanismus inhibice angiogeneze carotuximabem je skrze inhibici interakce mezi endoglinem a VEGFR-2 [80].

Po navázání VEGF-A na receptor VEGFR-2 dochází k fosforylaci tohoto receptoru a signální kaskádě, která vede k angiogenezi. Endoglin a VEGFR-2 mechanicky vytvoří komplex na povrchu buňky, čímž se zabrání internalizaci (přesun molekuly z povrchu do nitra buňky) a následné degradaci tohoto receptoru (obrázek 15). Za tuto interakci je zodpovědná cytoplazmatická doména endoglinu. Interakce mezi endoglinem a VEGFR-2 zvyšuje VEGF-A signalizaci a tím indukovanou angiogenezi [80].



Obrázek 15: Interakce mezi endoglinem a VEGFR-2. Ve vedoucích endotelových buňkách nově se tvořící vaskulatury (tip cells) endoglin udržuje VEGFR-2 na buněčném povrchu, čímž zabráňuje jeho degradaci v lysosomech. To vede k tomu, že tyto buňky zůstávají citlivé na VEGF. Převzato z [80].

Carotuximab v závislosti na dávce inhibuje VEGF-indukovanou fosforylaci VEGFR-2. Vazba carotuximabu na extracelulární doménu endoglinu způsobí, že endoglin nebude přístupný pro VEGFR-2, naruší se jejich interakce a podpoří se následná internalizace a degradace VEGFR-2 [80].

Další mechanismus účinku carotuximabu, který ovlivňuje angiogenezi, je indukce štěpení membránového endoglinu prostřednictvím MMP-14, jak již bylo ukázáno na obrázku 14. Takto generovaný sEng funguje jako lapač ligandu (BMP-9), a tak snižuje signalizační dráhu [84].

Vazba carotuximabu na endoglin dále indukuje na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) zprostředkovanou NK buňkami, neutrofily a monocyty, což vede k apoptóze cílových buněk [84].

V neposlední řadě je nutné zmínit, že regulační T-buňky v nádorové tkáni exprimují endoglin ve zvýšené míře. Zdá se, že carotuximab inhibicí endoglinu eliminuje tuto imunosupresivní populaci z mikroprostředí nádoru. Kombinace carotuximabu s PD-1 inhibitory (například nivolumabem) výrazně zvyšuje terapeutický efekt u experimentálních zvířat [85].

2.6.3 Léčba carotuximabem

Carotuximab byl vyvinut firmou TRACON Pharmaceuticals se sídlem v Kalifornii, USA, a původně byl zamýšlen jako protinádorová léčba u pacientů s pokročilým nebo metastazujícím angiosarkomem, společně v kombinaci s pazopanibem (Votrient). Klinické studie ale byly ukončeny, protože tato léčba nepřinášela uspokojivé výsledky. Vývoj byl místo toho zaměřen na oftalmologickou indikaci – exudativní věkem podmíněná makulární degenerace, společně v kombinaci s VEGF inhibitorem (ranibizumab, obchodní název Lucentis). Carotuximab měl pro použití v oftalmologii označení DE-122 a jeho administrace byla formou vodného očního injekčního roztoku. Vývoj zastřešoval Santen Pharmaceutical Company, partner Traconu, ale kvůli nedostatečnému efektu od vývoje upustil [86] [87].

Kombinace carotuximabu a monoklonální protilátky proti VEGF-A vykazovala na myších modelech součinnost při inhibici neoangiogeneze [80]. Kromě kombinace carotuximabu s pazopanibem u pacientů s angiosarkomem také probíhaly klinické studie pro kombinaci carotuximabu například s bevacizumabem (glioblastom, choriokarcinom), s axitinibem (rakovina ledvin), kapecitabinem (metastazující rakovina prsu) či abirateronem a enzalutamidem (rakovina prostaty). Nicméně i tyto studie byly pro nepřesvědčivé výsledky ukončeny a v současné době probíhá pouze klinické hodnocení předoperační kombinace letrozolu, everolimu a TRC105 u postmenopauzálního karcinomu prsu s pozitivním hormonálním a Her2 negativním receptorem [88].

Endoglin je exprimován ve fibroblastech asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblasts, CAF) u různých typů rakoviny. Tyto CAF hrají důležitou roli v progresi a tvorbě metastáz například u rakoviny prsu [89]. Použití carotuximabu u nádorových modelů vedlo ke sníženému počtu těchto fibroblastů asociovaných s nádorem [10].

Kromě toho může terapeutické zacílení endoglinu přesahovat onkologii. Expres endoglinu byla prokázána na aktivovaných fibroblastech u srdeční fibrózy, kde jeho inhibice v preklinických modelech snížila srdeční fibrózu a zlepšila výsledky [84] [90].

2.7 Imunohistochemie

Imunohistochemie je technika, která využívá protilátky (imuno-) za účelem detekce určitého antigenu v buňkách řezu tkáně (histo-). Protilátky se specificky vážou na antigeny a tato vazba protilátka-antigen může být různými způsoby vizualizována [91] [92].

Příprava vzorku zahrnuje fixaci za účelem konzervace odebrané tkáně a zachování její integrity pro následné umožnění detekce protilátek. Způsob fixace závisí na typu proteinu, který

má být vizualizován. Rozlišujeme chemickou a fyzikální fixaci. Chemická fixace využívá látky, které mohou působit buď zesíťováním proteinů nebo jejich vysrážením, což může maskovat antigen, zhoršovat přístupnost protilátky nebo měnit buněčnou lokalizaci určitých proteinů. Chemickou fixaci lze provést ponořením nebo perfuzí. Tento typ fixace umožňuje dlouhodobé uchování zafixovaného vzorku při pokojové teplotě a také umožňuje krájet tenké řezy na mikrotomu (4-5 μm). Metoda ponoření spočívá v ponoření tkáně do velkého objemu fixačního roztoku (50-100x větší než objem vzorku) přibližně na 18-24 hodin. Metoda perfuze je založena na infuzi fixačního prostředku cévním systémem experimentálního zvířete. Proces perfuze je však ve srovnání s ponořením technicky složitý a časově náročný. Po perfuzi je možné požadovanou tkáň extrahovat a dále fixovat ponořením, aby byla zajištěna plná fixace požadované tkáně [91].

Některé fixační prostředky jako formalín či paraformaldehyd působí zesíťováním proteinů tvorbu methylenových můstků. Tyto můstky mohou maskovat epitop antigenu, a tím snížit schopnost detekovat jej pomocí protilátky [91]. Je nezbytné demaskovat tyto epitopy, aby byla umožněná vazba protilátek, a to buď teplem (heat induced epitope retrieval, HIER) nebo enzymatickým štěpením (proteolytic induced epitope retrieval, PIER). Obě metody vedou k rozvinutí methylenových můstků, čímž obnoví antigenicitu. Další fixační roztoky jsou například methanol, aceton, Bouinův roztok (obsahující kyselinu pikrovou), Zamboniho roztok nebo roztok glutaraldehydu [91] [92].

Pro další zlepšení uchování mohou být tkáně, které byly chemicky fixovány, zality do parafinu. Tento krok umožňuje dlouhodobé uchování vzorku. Tkáně však musí být před barvením zbaveny parafinu, protože hydrofobní povaha parafinu by interferovala s barvením protilátek ve vodných roztocích [91].

Tkáně, ve kterých by antigen mohl být negativně ovlivněn chemickou fixací, mohou místo toho podstoupit fyzickou fixaci, která zahrnuje zmrazení a sušení. Zmrazení spočívá v uložení tkání do kryogenních materiálů a jejich následném rychlém zmrazení v kapalném dusíku. Zmrazené řezy však mají omezenou skladovací kapacitu a speciální požadavky na skladování (maximálně jeden rok při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a řezy tkáně zhotovené v kryostatu jsou oproti chemické fixaci silnější (7-8 μm), což má za následek horší mikroskopické rozlišení. Kromě toho může tvorba ledových krystalů ovlivnit architekturu tkáně. Sušení lze použít pro určité typy tkání nebo tekutin, jako jsou například krevní nátěry [91] [92].

Před značením sledovaného antigenu protilátkou je důležité provést blokovací krok, aby se snížila nespecifická vazba protilátky (mohla by poskytovat falešně pozitivní výsledek). Toho je dosaženo inkubací tkáně s roztoky obsahujícími proteiny nebo jiné molekuly, které se budou vázat na snadno reaktivní nespecifická místa, čímž se zablokuje schopnost protilátky vázat se na tato místa. Mezi běžné blokuující roztoky patří například roztoky proteinů jako je hovězí sérový albumin nebo odtučněné sušené mléko [91]. Kromě blokování nespecifické vazby protilátky může být nutné blokovat endogenní expresi určitých enzymů jako je peroxidáza a alkalická fosfatáza (které se běžně používají ke katalýze reakce poskytující barevný produkt) [92], a endogenních molekul jako je biotin. Potřeba tohoto blokovacího kroku je určena tím, k čemu je protilátka konjugována. Pokud je například sekundární protilátka konjugována s křenovou peroxidázou, pak je cílem, aby tato protilátka detekovala pouze peroxidázu specifickou pro primární protilátku, a ne všechny endogenní peroxidázy, které mohou být přítomny v tkáni. Potřeba tohoto blokovacího kroku je také určena typem tkáně, protože endogenní exprese těchto enzymů a molekul se mezi typy tkání liší. Například blokování aktivity endogenní peroxidázy je důležité ve tkáni ledvin, kde je vysoká aktivita peroxidázy, ale nikoli v tukové tkáni [91].

Monoklonální protilátky jsou produkovány jedinou populací B-lymfocytů a rozpoznávají jeden epitop. Naproti tomu polyklonální protilátky pocházejí z více populací B-lymfocytů a mohou rozpoznávat více epitopů na stejném antigenu. Monoklonální protilátky jsou proto vysoce specifické, zatímco polyklonální protilátky jsou odolnější vůči změnám v konformaci proteinů, protože se mohou vázat na více epitopů [91].

Základní typy imunohistochemických metod jsou enzymatická, fluorescenční a amplifikační [92].

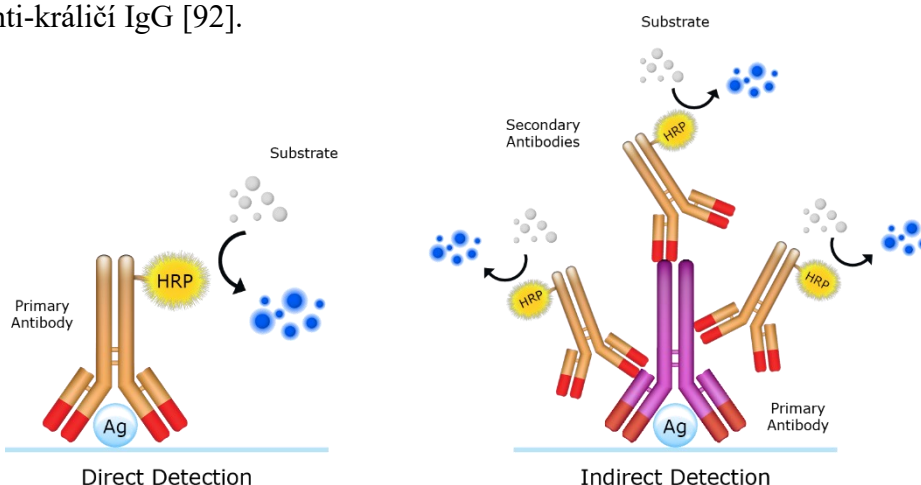
2.7.1 Enzymatická metoda

U enzymatické metody je protilátka použita pro detekci antigenu před reakcí označena enzymem. Po navázání na cílový antigen dojde k vytvoření komplexu, kde enzym po reakci s chromogenem katalyzuje substrát za vzniku nerozpustného barevného produktu. Následně může být produkt analyzován pod světelným nebo elektronovým mikroskopem. Lze provést přímou nebo nepřímou detekci. Jako obvyklý chromogen pro křenovou peroxidázu se používá DAB (3,3'-diaminobenzidin), který vytváří tmavě hnědý nerozpustný produkt. Dále je možné použít například AEC (3-amino-9-ethylkarbazol), který poskytuje tmavě červenou reakci. Zástupci chromogenů pro alkalickou fosfatázu jsou například NBT (nitro blue tetrazolium)

v kombinaci s BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolyl-fosfát), které po kontaktu se substrátem mění barvu na modrofialovou nebo černofialovou [92].

Přímá metoda (viz obrázek 16) je jednokrokový proces barvení, kdy označená protilátka (např. protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou) přímo reaguje s požadovaným antigenem. Komplex antigen-protilátka-křenová peroxidáza se pak ponechá reagovat s chromogenem (DAB) a substrátem za účelem vytvoření zbarvení [92].

Nepřímá metoda (viz obrázek 16) je dvoustupňový proces, kdy se neznačená primární protilátka (první vrstva), váže na cílový antigen ve vzorku, a enzymem značená sekundární protilátka (druhá vrstva) reaguje s primární protilátkou. Sekundární protilátka musí být proti IgG živočišného druhu, ve kterém byla vytvořena primární protilátka. Například pokud je primární protilátkou králičí anti-lidský IgG, enzymem značená sekundární protilátka by mohla být kozí anti-králičí IgG [92].



Obrázek 16: Rozdíl mezi přímou a nepřímou detekcí. Při přímé detekci se na antigen váže protilátka označená enzymem (horseradish peroxidase, HRP), který následně po reakci s chromogenem způsobí zbarvení substrátu. Při nepřímé detekci je na primární protilátku navázána sekundární protilátka, která je značena enzymem. Převzato z [93].

Existují také metody s neznačenými protilátkami. Metoda enzymového můstku je jednou z takových metod, kdy se enzym váže na cílový antigen prostřednictvím reakce mezi antigenem a protilátkou imunoglobulinového enzymového můstku. Metoda peroxidáza-antiperoxidáza (PAP) využívá imunizaci protilátky skupinou křenové peroxidázy k vytvoření protilátky proti křenové peroxidáze, která je zase schopná vázat se na jinou skupinu křenové peroxidázy za vzniku stabilního mnohoúhelníku [92].

Po obarvení cílového antigenu se obvykle aplikuje sekundární barvení pro lepší kontrastní rozlišení obarvených struktur. Některá barviva obarvují specifické buněčné kompartmenty, jiná

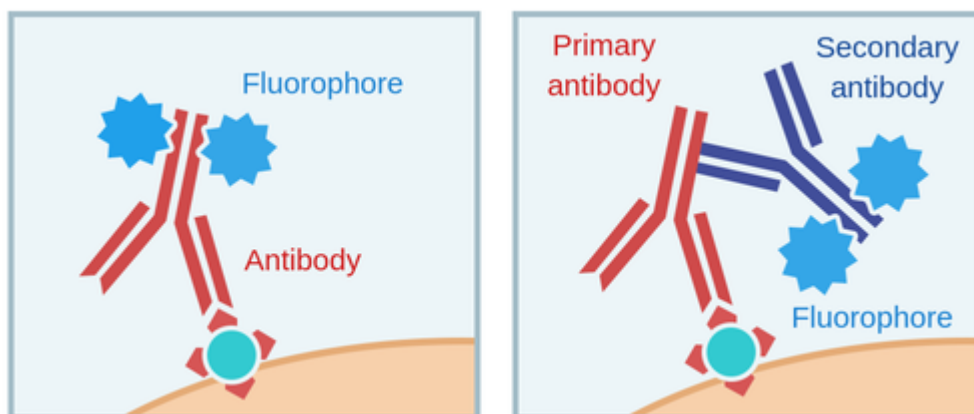
barviva obarvují celé buňky. Některé z nejběžnějších kontrastních barviv zahrnují hematoxylin (barví buněčná jádra do modra), methylovou zeleň nebo nuclear fast red (zbarvuje jádra do červena) [92].

2.7.2 Imunofluorescenční metoda

Imunofluorescenční metoda je využívána pro identifikaci antigenu po jeho vystavení protilátkám, které jsou značené fluorescenčním barvivem (fluorochromem). Specifická vazba protilátky je následně detekována fluorescenčním mikroskopem [94].

Proces nepřímé metody zahrnuje tři kroky. Nejprve se primární protilátka specificky váže na cílový antigen. Sekundární protilátka značená fluorochromem se poté váže na primární protilátku. Na závěr je fluorochrom detekován pomocí mikroskopie. Přímá metoda je analogická přímému postupu u enzymatické metody, tedy s vynecháním sekundární protilátky [92], porovnání obou metod je uvedeno na obrázku 17.

Některé z běžně používaných fluorochromů jsou například fluorescein, Cy3 nebo Cy5. Mezi kontrastní barviva, zejména pro barvení jader a chromozomů, patří například DAPI, Hoechst 33342 nebo propidium jodid [95]. Po obarvení by měly být vzorky ihned pozorovány a zobrazeny pod fluorescenčním mikroskopem [92].

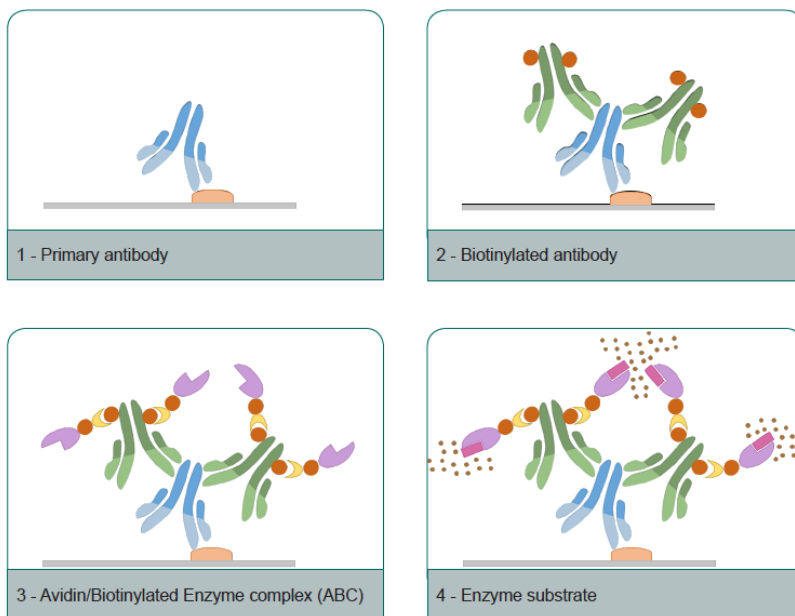


Obrázek 17: Rozdíl mezi přímou a nepřímou imunofluorescencí. Při nepřímé fluorescenci se na primární neznačenou protilátku váže sekundární protilátka s fluoroforem [94].

2.7.3 Amplifikační metody

Citlivost imunohistochemie lze zlepšit použitím vyššího počtu molekul enzymu vázaných na tkáň. Metoda avidin-biotin komplexu (ABC, obrázek 18) využívá pevné vazby avidinu s biotinem. Avidin, protein vaječného bílku, má čtyři vazebná místa pro nízkomolekulární vitamín biotin. Některá vazebná místa mohou být obsazena biotinylovanou molekulou protilátky, která tak tvoří můstek. Streptavidin je tetramerní protein vázající biotin, který je

izolován ze *Streptomyces avidinii*. Metody avidinu a streptavidinu fungují téměř identicky, protože jejich struktury jsou velmi podobné. Metoda ABC a značená vazba streptavidinu (labeled streptavidin binding, LSB) jsou dvě nejpoužívanější metody pro amplifikaci signálu cílového antigenu [92].



Obrázek 18: ABC metoda. Na vzorek tkáně se aplikuje primární protilátka (naváže se na cílový antigen), a poté se přidá biotinylovaná sekundární protilátka, která má specifitu proti primární protilátce. U enzymatické metody se biotinylovaný enzym (křenuvá peroxidáza nebo alkalická fosfatáza) smíchá s avidinem (či streptavidinem) za vzniku komplexu ABC (či LSB), a následně se tento komplex přidá ke vzorku tkáně. U fluorescenční detekce se použije kombinace avidinu či streptavidinu a fluorescenčního barviva. Převzato z [96].

Montovací médium se používá k připevnění krycího sklíčka a zajišťuje trvalost vzorku. Obecně platí, že výběr média závisí na několika faktorech, včetně chemické kompatibility s chromogenem a kontrastním barvivem. Neutrální montovací média jsou olejovité látky s pH 7,0 (například pryskyřice). Ve vodě rozpustná montovací média obvykle obsahují 50 % glycerolu [92].

3 Cíle diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo analyzovat změny exprese endoglinu a markerů zánětu VCAM-1 a ICAM-1 u experimentálního myšního modelu jaterní fibrózy, která byla indukována podáváním diety s obsahem 3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidinu (DDC). Dále jsme chtěli objasnit vliv podávání carotuximabu na expresi těchto markerů po indukci fibrózy s cílem zjistit, zda carotuximab inhibicí endoglinu ovlivňuje proces jaterní fibrózy.

4 Experimentální část

4.1 Experimentální zvířata

Jako experimentální zvířata byly použity tříměsíční C57BL/6 myši (samci) s váhou 21-28 g. Jejich chov probíhal v prostředí se zabezpečeným 12hodinovým cyklem světlo/tma a volným přístupem k vodě. Myši byly rozděleny do tří skupin (n=6 v každé skupině) – kontrolní skupina, DDC skupina a DDC/TRC105 skupina. Zvířatům v kontrolní skupině bylo podáváno standardní krmivo (chow diet), zatímco DDC skupina a DDC/TRC105 skupina byla krmena 0,1% DDC dietou. Během experimentálního chovu byl kontrolní a DDC skupině dvakrát týdně po dobu čtyř týdnů podáván fyziologický roztok (5 mg/kg), zatímco zvířatům v DDC/TRC105 skupině byl podáván TRC105 (5 mg/kg). Po těchto čtyřech týdnech byla provedena eutanazie s následným odběrem krve a jaterních vzorků. Se všemi zvířaty bylo zacházeno dle doporučeného postupu Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Veškeré experimenty byly vykonány v souladu se zákonem 246/1992 Sb. (Zákon na ochranu zvířat proti týrání).

4.2 Metodika

Játra byla fixována v tekutém dusíku a zmrazena, krájena na kryostatu na 7 µm tlusté řezy a uchovávána v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro následné barvení olejovou červení a imunohistoanalýzu byla sklíčka s řezy vybrána náhodně se zachováním stejného počtu sklíček pro každý marker. Veškeré postupy probíhaly dle protokolů – barvení olejovou červení, detekce endoglinu, VCAM-1 (světelná mikroskopie), kolokalizace VCAM-1 a endoglinu, ICAM-1 (fluorescenční mikroskopie).

4.2.1 Imunohistochemické protokoly

Barvení olejovou červení je histochemická metoda používaná pro prokázání tukových buněk a steatózy. Nejprve je nutné připravit mateřský roztok: 0,5 g olejové červeně (Sigma-Aldrich, O0625) se přes noc nechá rozpouštět ve 100 ml isopropylalkoholu (Lach-Ner, 20037-AT0). Následující den se ke 30 ml mateřského roztoku přidá 20 ml destilované vody a přefiltruje se do kyvety. Mezitím je třeba vyndat z mrazáku sklíčka s řezy a nechat proschnout alespoň po dobu 20 minut. V dalším kroku se sklíčka s řezy ponoří do kyvety s připravenou olejovou červení a po 10 minutách se provede oplach v pramenité vodě. Dále se sklíčka ponoří na 10-15 sekund do neředěného hematoxylinu (Merck, 104302), který barví jádra buněk do modré barvy, a poté se opět provede oplach v pramenité vodě. Na závěr se na řezy nanese vodné

montovací médium (DABCO – 1,4-diazobicyclo[2.2.2]oktan), překryje se krycím sklíčkem a nechá se usušit. Takto připravené preparáty se skladují v lednici při 2-8 °C. Protokol je uveden na obrázku 19.

OIL RED

1. Příprava mateřského roztoku (neskladovat dlouho)

0,5 g oil red na 100 ml isopropanolu

Nechat rozpouštět přes noc

2. Příprava pracovního roztoku

60 ml mateřského roztoku + 40 ml destilované vody

Do kyvety stačí 30 ml mateřského roztoku a 20 ml destilované vody

Přefiltrovat

3. Postup

a. Řezy vyndat z mrazáku a nechat oschnout	20 min
b. Oil red	10 min
c. Pramenitá voda	oplach
d. Hematoxylin neředěný	10-15 s
e. Pramenitá voda	oplach
f. Montování do vodného média (DABCO)	

Obrázek 19: Protokol pro barvení olejovou červení. Pozorování proběhlo pod světelným mikroskopem.

Pro detekci endoglinu (BD PharmingenTM, 550546) i VCAM-1 (BD PharmingenTM, 550547) byly použity primární protilátky z potkana (rat anti mouse) a enzymatická imunohistochemická metoda goat anti rat ImmPRESSTM – sekundární protilátka z kozy společně s polymerním enzymem peroxidázou (Vector Laboratories, MP-7444-15). Postup u obou markerů je stejný, liší se pouze délkou reakce s DAB. Společný protokol je uveden na obrázku 20.

Sklička s řezy se po vyjmutí z mrazáku ponechají alespoň 20 minut rozmraznout při pokojové teplotě a poté se na dalších 20 minut ponoří do kyvety s acetonem (Lach-Ner, 20001-AT0), která je umístěna v mrazáku. Mezitím se připraví mléko z 0,5 g sušeného mléka (Cell Signaling Technology, 9999S) v 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr o pH 7,4), který se připraví přidáním 900 ml destilované vody ke 100 ml zásobního PBS. Po vyjmutí sklíček z acetonu a usušení po dobu 5 minut se poloha řezů na sklíčku označí ethanolvým perem a takto značená sklíčka se na 5 minut ponoří do kyvety s připraveným PBS. Poté se nechají řezy po dobu 30 minut inkubovat s mlékem pro zabránění nespecifických reakcí (100 μ l na každé sklíčko). Primární protilátka se připraví naředěním v BSA (Bovine Serum Albumin, hovězí sérový albumin) dle požadované koncentrace v protokolu, viz obrázek 20. BSA se připravuje do zásoby rozpuštěním 5 g lyofilizátu bez mastných kyselin (Biosera, PM-T1727) a skladuje se v mrazáku. Po uplynutí 30 minut se sklíčka opláchnou v kyvetě s PBS, na každé sklíčko se nanese 50 μ l naředěné primární protilátky a ponechá se inkubovat 60 minut. Následně se sklíčka ponoří na 10 minut do PBS (v polovině intervalu se vymění starý PBS za nový), a vloží se na dalších 15 minut do kyvety s H₂O₂, který se připraví ze 70 ml PBS a 8 ml 30% H₂O₂ (Penta, 23980-11000). Následuje opětovné promytí v PBS po dobu dvakrát 5 minut a poté aplikace jedné kapky ImmPRESSTM (1 kapka odpovídá 50 μ l) na každé sklíčko s inkubací po dobu 30 minut. Po dalším promytí v PBS je aplikováno 50 μ l DAB (Abcam, ab64238) na každé sklíčko pro zviditelnění polymerního enzymu navázaného na sekundární protilátce. DAB se používá v koncentraci 10 μ l chromogenu ku 500 μ l substrátu a délka aplikace se liší podle detekovaného markeru, viz obrázek 20. Sklíčka se opláchnou v PBS, přenesou do vaničky, ponoří na 5 sekund do hematoxylinu ředěného destilovanou vodou (koncentrace 1:50) a poté se nechají 1 minutu promývat pod tekoucí vodou (během tohoto procesu jádra zmodrají). Následuje rychlý oplach v acetonu, ponoření do acetonu a xylenu (Penta, 28440) v poměru 10:1 na 2 minuty a na další 2 minuty ponoření do acetonu a xylenu v poměru 1:10. Na závěr proběhne ponoření do tří vaniček se xylenem vždy v intervalu 3 minut s následným použitím Eukittu (Sigma-Aldrich, 03989) jakožto bezvodého montovacího média.

Endoglin/VCAM-1 (rat anti mouse), anti rat ImmPRESS™

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. Aceton (mrazák) | 20 min |
| 2. Usušit | 5 min |
| 3. PBS | 5 min |
| 4. Mléko (0,5 g do 10 ml PBS) | 30 min |
| 5. Primární protilátka v BSA | 60 min |
| 6. PBS | 2x 5 min |
| 7. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS) | 15 min |
| 8. PBS | 2x 5 min |
| 9. ImmPRESS™ goat anti rat | 30 min |
| 10. PBS | 2x 5 min |
| 11. DAB (10μl v 500μl pufru) | 15 s endoglin, 25 s VCAM-1 |
| 12. PBS | oplach |
| 13. Hematoxylin 1:5 | 5 s + 1 min modráni |
| 14. Aceton | oplach |
| 15. Aceton/xylen (10:1) | 2 min |
| 16. Aceton/xylen (1:10) | 2 min |
| 17. Xylen 3x | 3 min |
| 18. Eukitt | |

primární protilátka	koncentrace	DAB
rat anti mouse endoglin (BD Pharmingen™, 550546)	1:50	15 s
rat anti mouse VCAM-1 (BD Pharmingen™, 550547)	1:100	25 s

Obrázek 20: Protokol pro enzymatickou imunohistochemii. Metoda ImmPRESS™ byla použita pro detekci endoglinu a VCAM-1, protokol uvádí rozdíly v koncentracích a době inkubace s DAB. Pozorování proběhlo pod světelným mikroskopem.

Postup pro kolokalizaci endoglinu s VCAM-1 je v prvních krocích obdobný. V pátém kroku se ovšem na řezy aplikuje 50 μ l smíšených primárních protilátek rat anti mouse VCAM-1 (BD PharmingenTM, 550547) a rabbit anti mouse endoglin (Abcam, ab221675). Po 60 minutách a promytí v PBS je pro zviditelnění endoglinu použito 50 μ l sekundární protilátky s červeným fluorescenčním barvivem Cy[®]3 goat anti rabbit (Vector Laboratories, CY-1300). Další promytí v PBS je následováno sekundární protilátkou rabbit anti rat s navázaným zeleným fluorescenčním barvivem (Vector Laboratories, FI-4001) pro zviditelnění VCAM-1. Opět následuje promytí v PBS a inkubace s Hoechstovým barvivem (Sigma-Aldrich, 14533), které slouží k obarvení jader do modra (50 μ l, koncentrace 1:1000, ředěno v PBS), po dobu 25 min. Po posledním promytí v PBS jsou řezy montovány do vodného VECTASHIELD[®] montovacího média (Vector Laboratories, H-1700) a překryty krycím sklíčkem. Pozorování pod fluorescenčním mikroskopem by mělo proběhnout nejpozději následující den. Souhrnný protokol zobrazuje obrázek 21.

Fluorescence rat anti mouse VCAM-1 – GREEN Fluorescein 488

Fluorescence rabbit anti mouse endoglin – RED Cy[®]3

1. Aceton (mrazák) 30 min
2. Usušit 5 min
3. PBS 5 min
4. Mléko (0,5 g do 10 ml PBS) 20 min
5. Kombinace primárních protilátek v BSA 60 min
6. PBS 2x 5 min
7. **Cy[®]3 goat anti rabbit protilátka v BSA** **30 min**
8. PBS 2x 5 min
9. **Fluorescein rabbit anti rat protilátka v BSA** **30 min**
10. PBS 2x 5 min
11. Hoechst (1:1000 v PBS) 25 min
12. PBS 2x 5 min
13. VECTASHIELD[®]

primární protilátka	koncentrace
rabbit anti mouse endoglin (Abcam, ab221675)	1:50
rat anti mouse VCAM-1 (BD Pharmingen [™] , 550547)	1:50
sekundární protilátka	
Fluorescein rabbit anti rat (Vector Laboratories, FI-4001)	1:100
Cy[®]3 goat anti rabbit (Vector Laboratories, CY-1300)	1:200

Obrázek 21: Protokol pro fluorescenční imunohistochemii. Detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1, pozorování proběhlo pod fluorescenčním mikroskopem.

Pro fluorescenční detekci ICAM-1 byla použita primární protilátka z kozy – goat anti mouse (R&D Systems, AF796) a po promytí v PBS byla přidána biotinylovaná sekundární protilátka horse anti goat (Vector Laboratories, BA-9500). Tato sekundární protilátka byla následně označena streptavidinem s navázaným červeným fluorescenčním barvivem Cy3 (Vector Laboratories, SA-1300) v koncentraci 1:100 v PBS. Zbytek protokolu probíhal stejně jako na obrázku 21, pro doplnění je však kompletně uveden na obrázku 22.

Fluorescence goat anti mouse ICAM-1 – **Cy[®]3 streptavidin**

- | | |
|---|---------------|
| 1. Aceton (mrazák) | 30 min |
| 2. Usušit | 5 min |
| 3. PBS | 5 min |
| 4. Mléko (0,5 g do 10 ml PBS) | 20 min |
| 5. Primární protilátka v BSA | 60 min |
| 6. PBS | 2x 5 min |
| 7. Horse anti goat biotinylovaná protilátka v BSA | 30 min |
| 8. PBS | 2x 5 min |
| 9. Cy[®]3 streptavidin v PBS | 30 min |
| 10. PBS | 2x 5 min |
| 11. Hoechst (1:1000 v PBS) | 25 min |
| 12. PBS | 2x 5 min |
| 13. VECTASHIELD [®] | |

primární protilátka	koncentrace
goat anti mouse ICAM-1 (R&D Systems, AF796)	1:20
sekundární protilátka	
horse anti goat, biotinylated (Vector Laboratories, BA-9500)	1:200 (v BSA)
Cy[®]3 streptavidin (Vector Laboratories, SA-1300)	1:100 (v PBS)

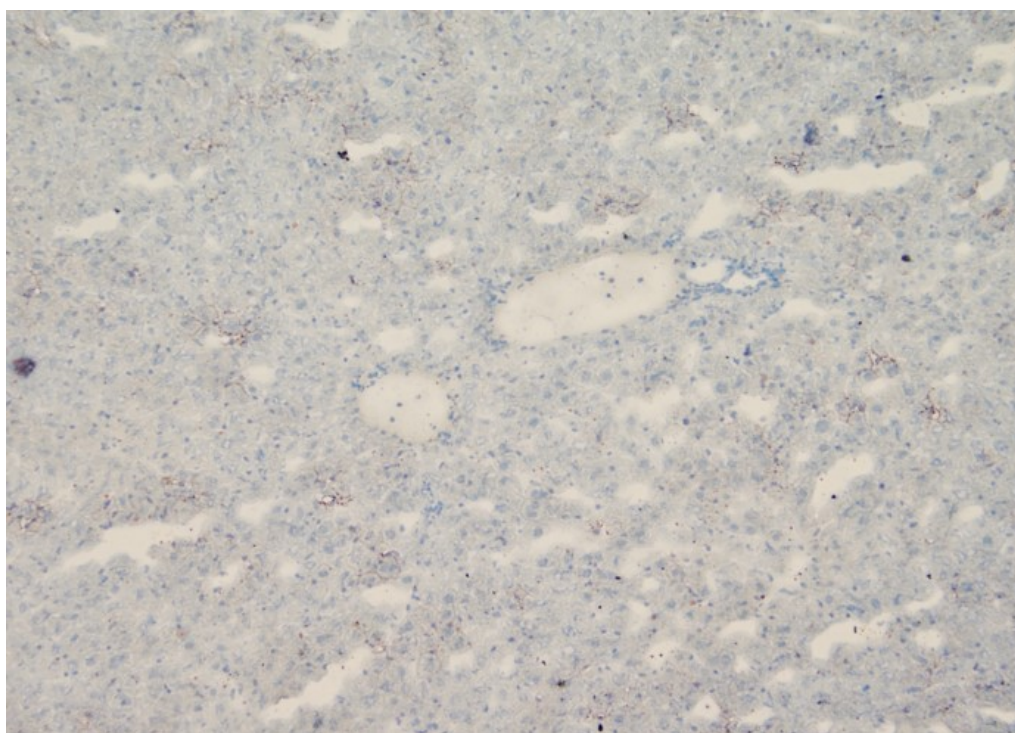
Obrázek 22: Protokol pro fluorescenční imunohistochemickou detekci ICAM-1.

5 Výsledky

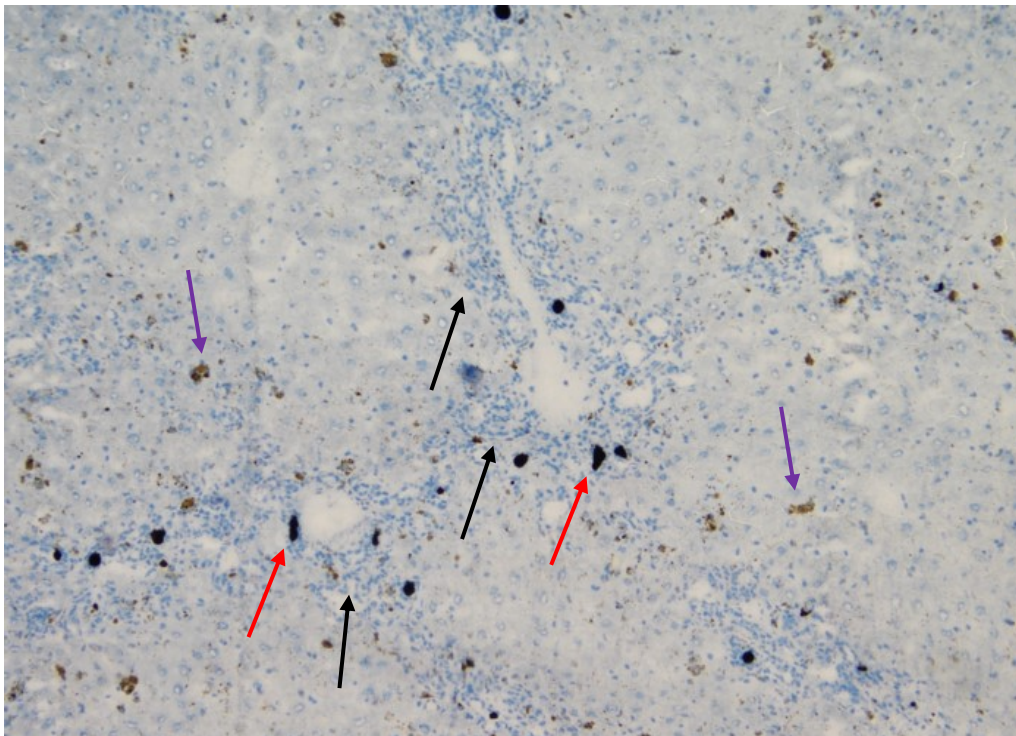
Výsledky experimentální části této diplomové práce jsou v této kapitole prezentovány formou snímků s legendou. Pro histochemické barvení olejovou červení jsou k dispozici tři reprezentativní snímky (tedy jeden snímek na skupinu – kontrolní, DDC a DDC/TRC105). Pro každý marker zánětu jsou k dispozici tři dvojice snímků, jedna dvojice pro každou skupinu, s výjimkou kolokalizace endoglinu a VCAM-1, kde je každá skupina reprezentována jedním snímkem. U všech DDC a DDC/TRC105 snímků jsou patrná depozita porfyrinového pigmentu, která vznikají v důsledku působení DDC na jaterní tkáň.

5.1 Reprezentativní snímky histochemického barvení olejovou červení

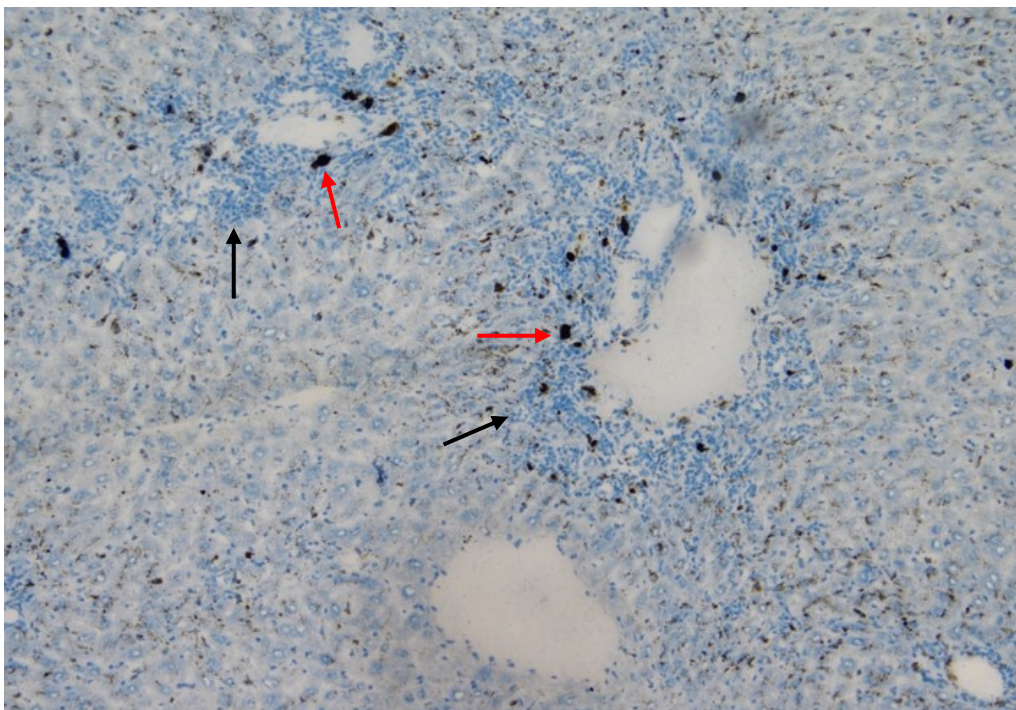
Histochemické barvení olejovou červení pro analýzu tukových depozit bylo provedeno na 12 sklíčkách po 2 řezech. Výsledky v těchto testovaných řezech neprokázaly žádné patologické barvení olejovou červení. Patologická steatóza tedy nebyla pozorována ani u kontrolní (obrázek 23), DDC (obrázek 24) ani u DDC/TRC105 skupiny (obrázek 25).



Obrázek 23: *Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny. Olejová červeň nebyla detekována. Zvětšení 200x.*



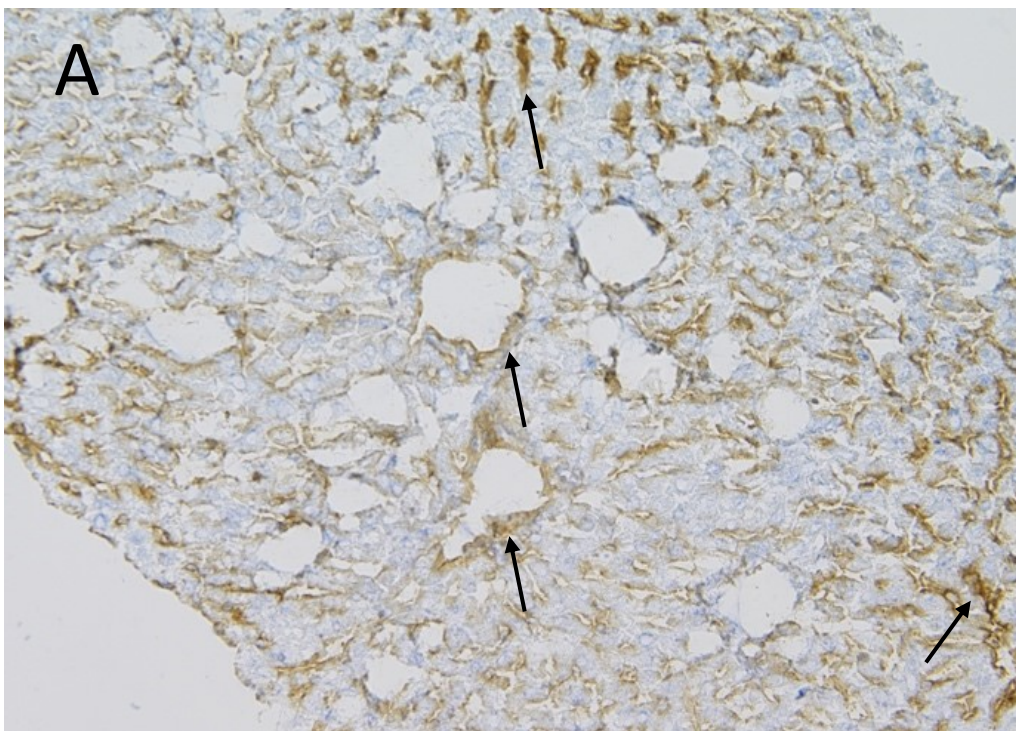
Obrázek 24: Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u DDC skupiny. Olejová červeň nebyla detekována. Zvýšená hustota modře obarvených jader v portobiliární oblasti značí zmnožení buněk (černé šipky). Fialové šipky označují lipofuscinový pigment, červené šipky označují porfyrinový pigment. Zvětšení 200x.

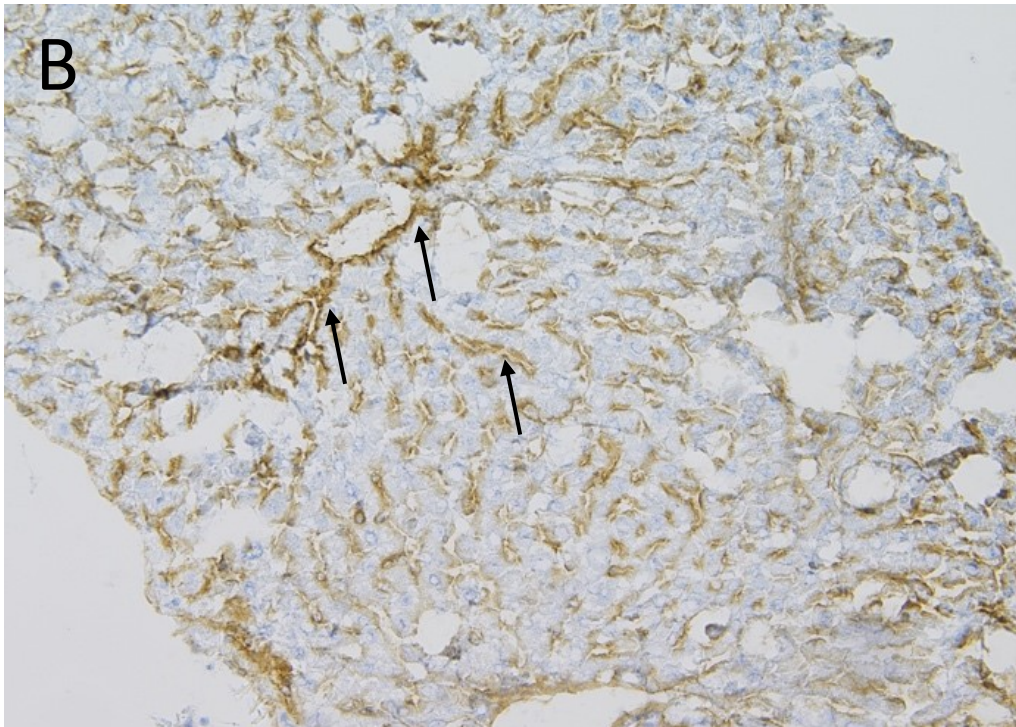


Obrázek 25: Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u DDC/TRC105 skupiny. Olejová červeň nebyla detekována. Depozita porfyrinu jsou označena červenými šipkami. Zvětšení 200x.

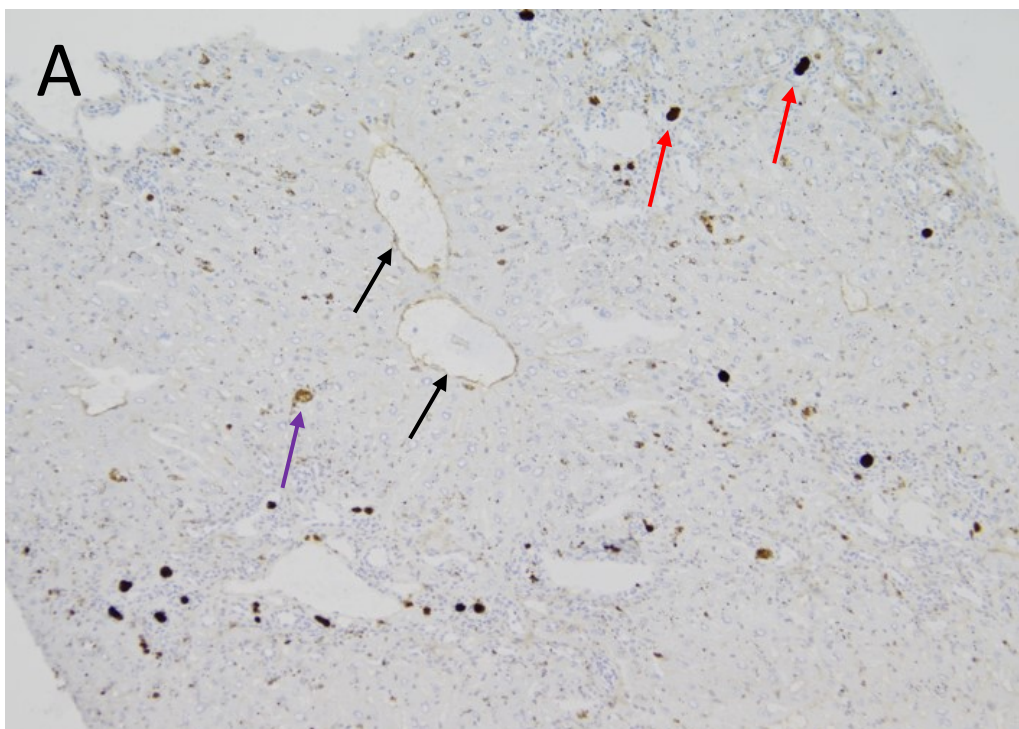
5.2 Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce endoglinu

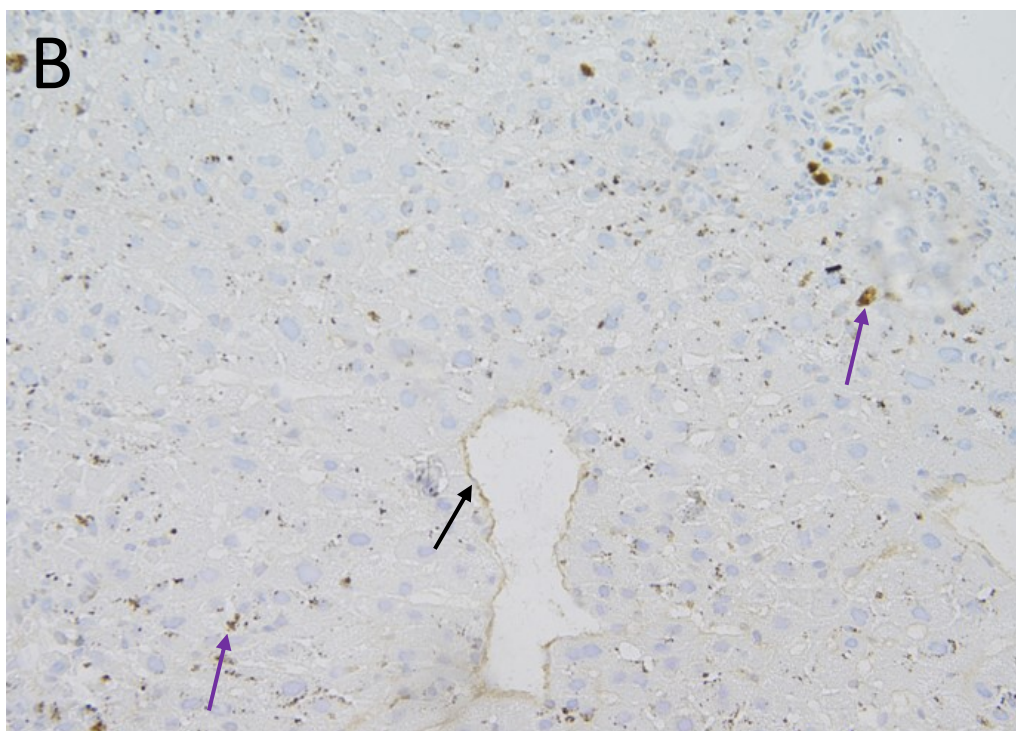
Imunohistochemická analýza exprese endoglinu byla provedena celkem na 36 sklíčkách po 2 řezech. U kontrolní skupiny byla detekována silná exprese endoglinu v endotelových buňkách sinusoid, cév portobiliárního prostoru a centrální žíly (obrázek 26 A, B). U DDC skupiny bylo jasně patrné snížení exprese endoglinu v endotelových sinusoidálních buňkách. V endotelových buňkách centrální žíly byla viditelná slabá exprese (obrázek 27 A, B). Podobné změny oproti kontrolní skupině byly patrné i ve skupině DDC/TRC105. Exprese endoglinu zde byla slabší a lokalizovaná pouze v endotelových buňkách centrální žíly, nikoli v sinusoidách či fibrotické oblasti (obrázek 28 A, B).



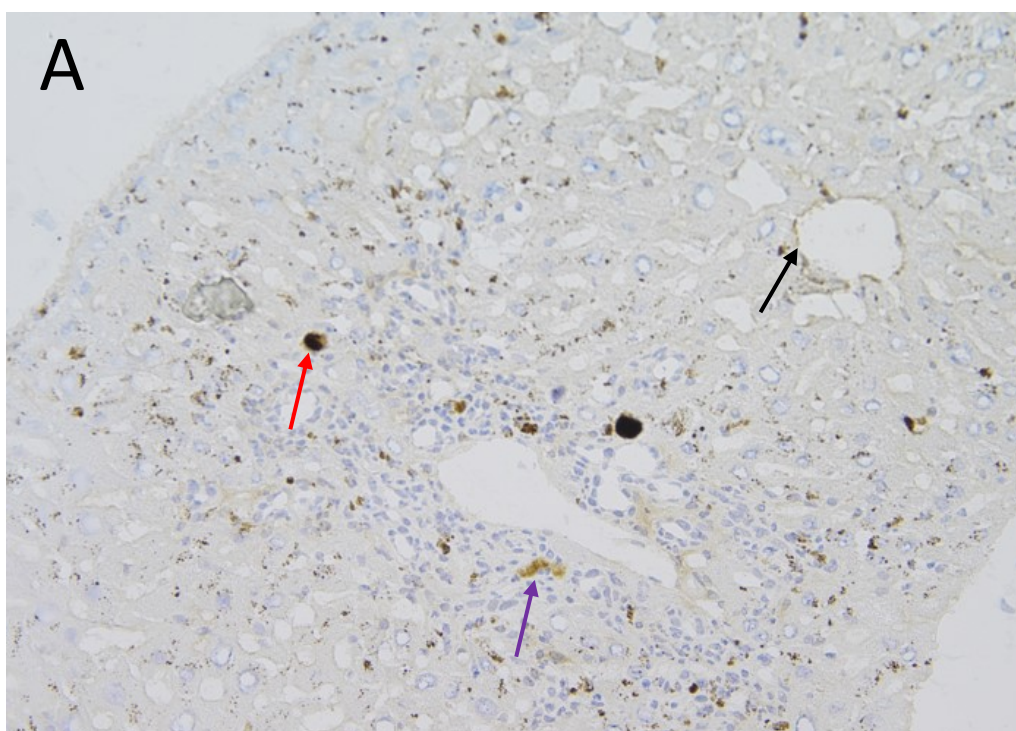


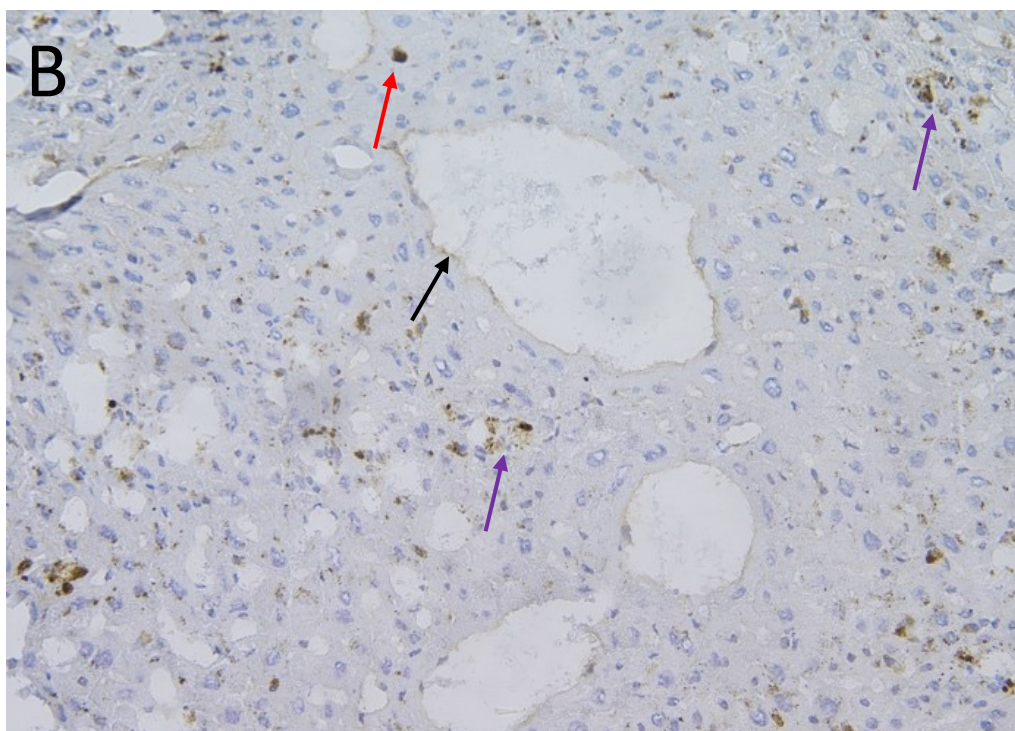
Obrázek 26: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u kontrolní skupiny. *Expresa je silná v endotelových buňkách sinusoid, centrální žíly i cév v portobiliární oblasti (černé šípky). Slabě fialovou barvou jsou zvýrazněna jádra buněk. Zvětšení 100x (u snímku A i B).*





Obrázek 27: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u DDC skupiny. Expze endoglinu je oproti kontrolní skupině výrazně snižená a objevuje se pouze v endotelových buňkách centrální žíly (černé šipky). Na snímku A jsou patrná depozita porfyrinového pigmentu (červené šipky). Lipofuscinový pigment je označen fialovými šipkami. Slabě fialová barva označuje jádra buněk. Zvětšení 100x (A), 200x (B).

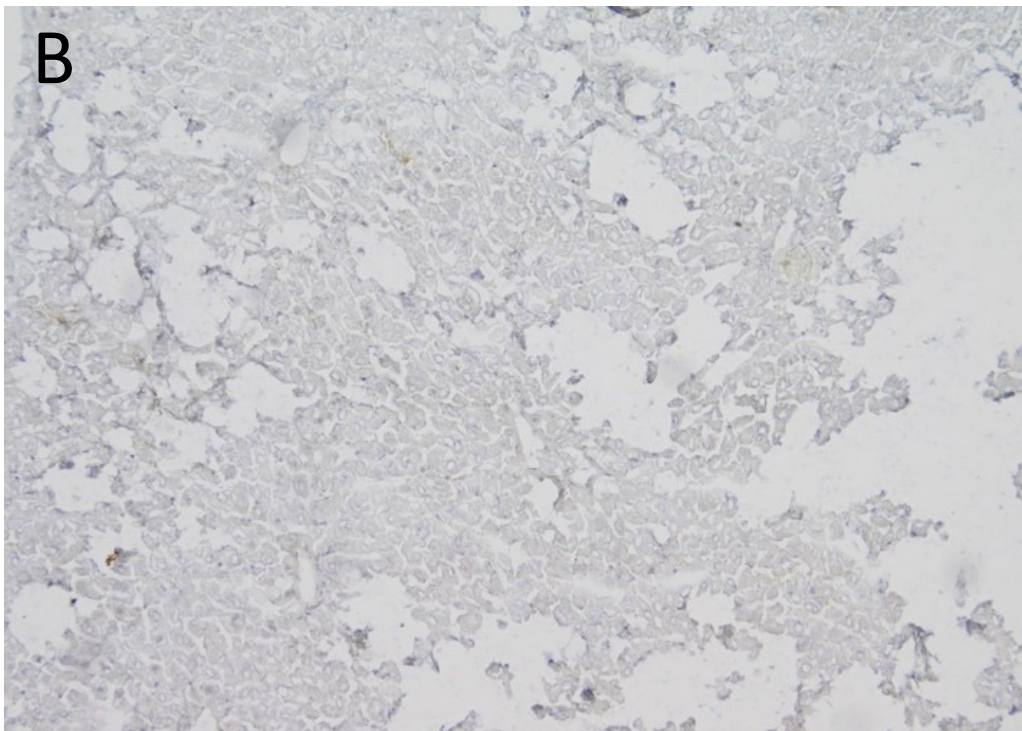
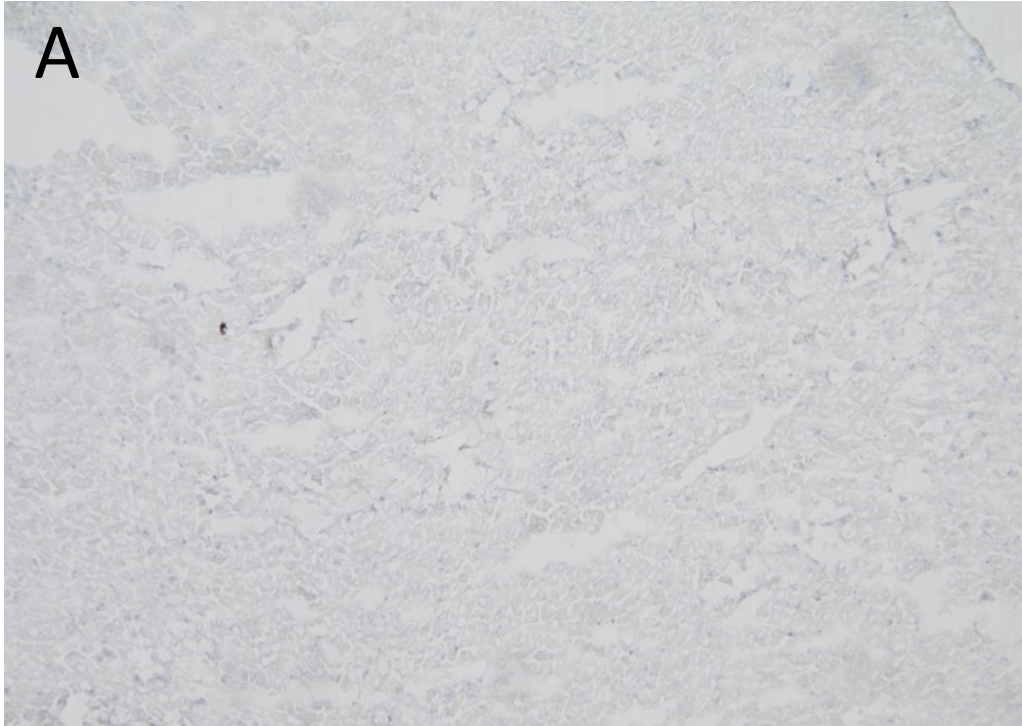




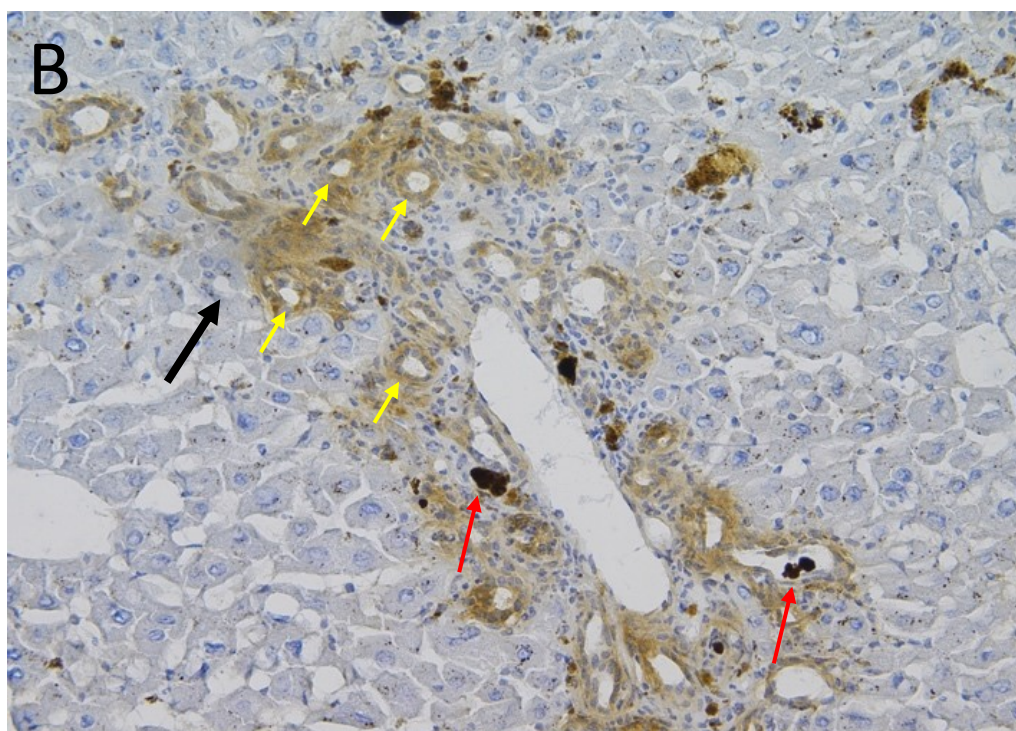
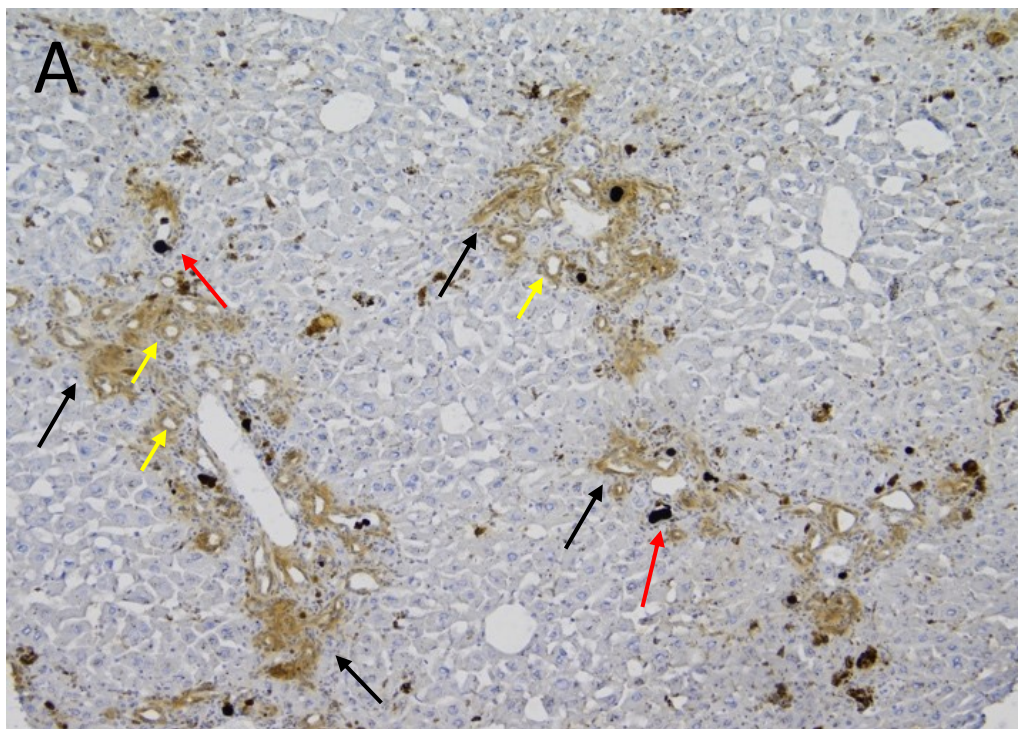
Obrázek 28: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u DDC/TRC105 skupiny. Podobně jako u DDC skupiny je i zde snižená exprese oproti kontrole. Endoglin je detekován v endotelu centrální žíly (černé šipky). Depozita porfyru jsou značena červenými šipkami, lipofuscinový pigment je označený fialovými šipkami. Zvětšení 100x (A), 200x (B).

5.3 Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce VCAM-1

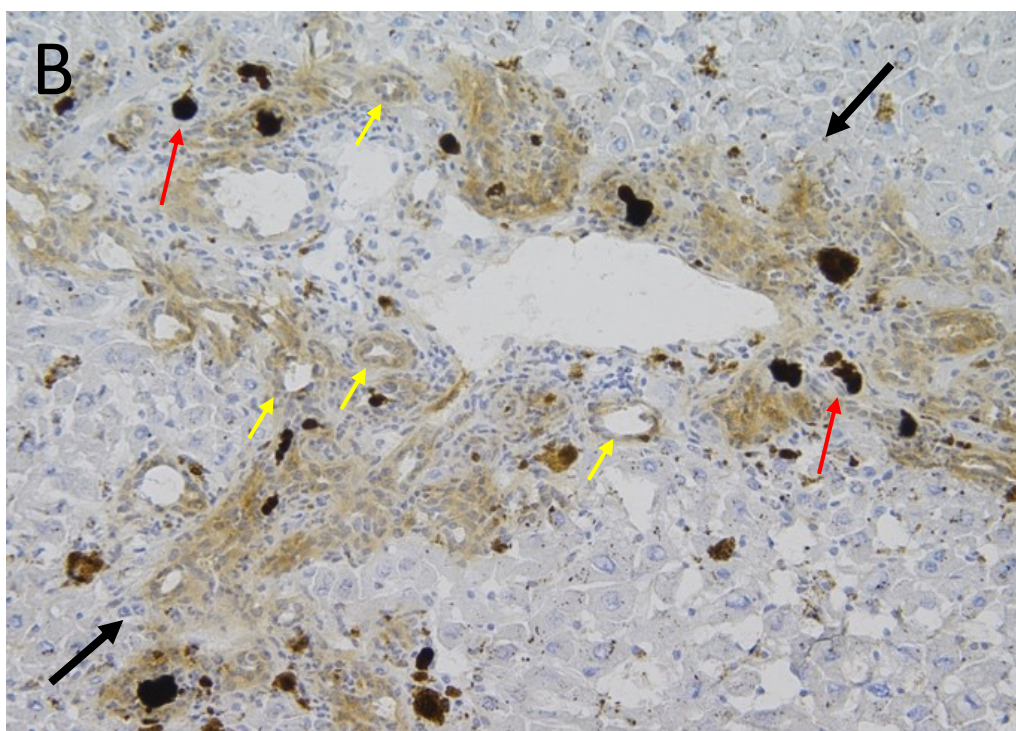
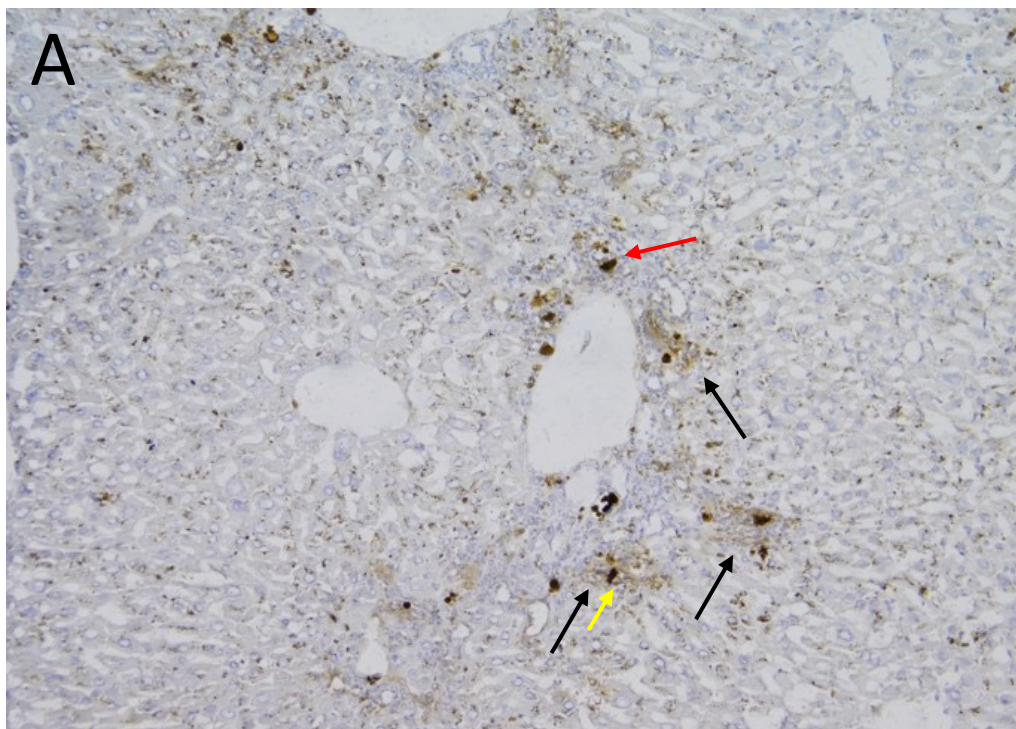
Imunohistochemická detekce exprese VCAM-1 byla taktéž provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. U kontrolní skupiny nebyla pozorována žádná exprese (obrázek 29 A, B). Oproti tomu byla pozorována silná exprese v portobiliární fibrotické oblasti u DDC skupiny. Výrazná exprese byla pozorována zvláště v epitelových buňkách žlučvodů (obrázek 30 A, B). V endotelových buňkách sinusoid však překvapivě nebyla exprese VCAM-1 pozorována. Podobně jako u DDC skupiny byla detekována exprese VCAM-1 v portobiliárních fibrotických oblastech u DDC/TRC105 skupiny (obrázek 31 A, B). Intenzita zabarvení značící expresi se zdá být v porovnání s DDC skupinou méně intenzivní, nicméně kvantifikace imunohistochemického barvení nebyla provedena.



Obrázek 29: *Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u kontrolní skupiny. Nebyla pozorována žádná exprese VCAM-1. Zvětšení 100x (A i B).*



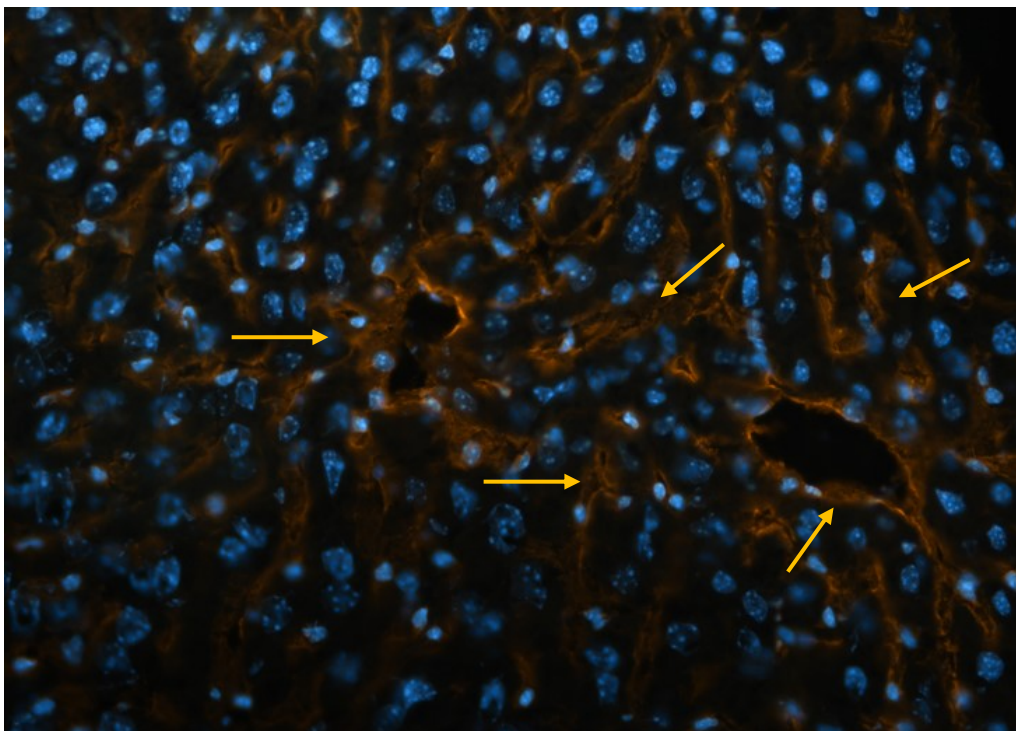
Obrázek 30: Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u DDC skupiny. Silnou expresi VCAM-1 je možno pozorovat v portobiliárních oblastech (které jsou již zasaženy fibrózou, černé šipky) a zejména v oblastech žlučových kanálků (žluté šipky). V sinusoidách exprese VCAM-1 nebyla detekována. Červené šipky označují depozita porfyrinového pigmentu. Světle fialová barva zvýrazňuje buněčná jádra. Zvětšení 100x (A), 200x (B).



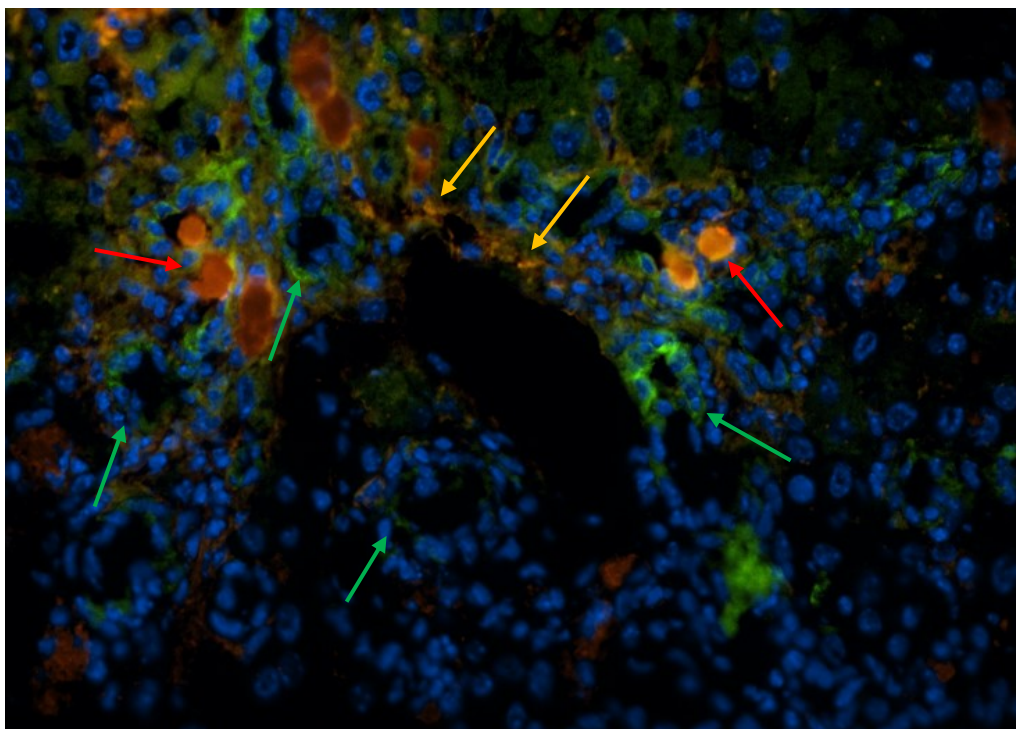
Obrázek 31: Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u DDC/TRC105 skupiny. Oblasti exprese jsou shodné s DDC skupinou (portobiliární oblasti označené černými šipkami, zejména epitel žlučových kanálků, který je označen žlutými šipkami). Porfyrinový pigment je označený červenými šipkami. Zvětšení 100x (A), 200x (B).

5.4 Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1

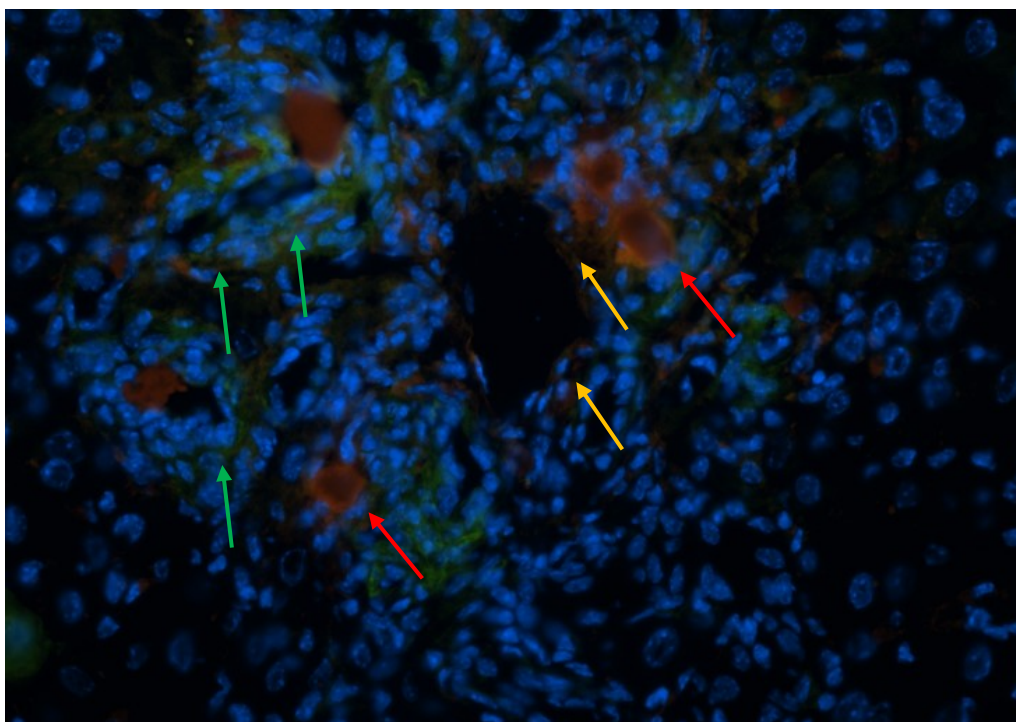
U všech tří skupin zvířat byla provedena detekce případné kolokalizace endoglinu a VCAM-1 imunofluorescenční metodou. U kontrolní skupiny výsledky odpovídaly předchozím zjištěním, tedy že ve zdravých játrech nebyla exprese VCAM-1 pozorována, a tedy nebyla patrná ani při kolokalizaci s endoglinem. V endotelových buňkách sinusoid a větších cév byla viditelná silná exprese endoglinu (červená barva, obrázek 32). U DDC i DDC/TRC105 skupiny byla exprese endoglinu slabá, a to převážně v oblasti endotelových buněk centrální žíly. Obě tyto skupiny vykazovaly vysokou expresi VCAM-1 (zelená barva) převážně v portobiliárních oblastech, zejména v oblastech žlučových. Nicméně, imunofluorescenční barvení v těchto oblastech neprokázalo žádnou kolokalizaci s endoglinem (obrázek 33 a 34). Jádra buněk jsou označena modrou barvou.



Obrázek 32: Reprezentativní snímek detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1 u kontrolní skupiny. Exprese VCAM-1 nebyla detekována. Exprese endoglinu je velmi výrazná, nachází se v endotelových buňkách cév a je reprezentována červenou barvou (oranžové šipky). Jádra buněk svítí modře. Zvětšení 400x.



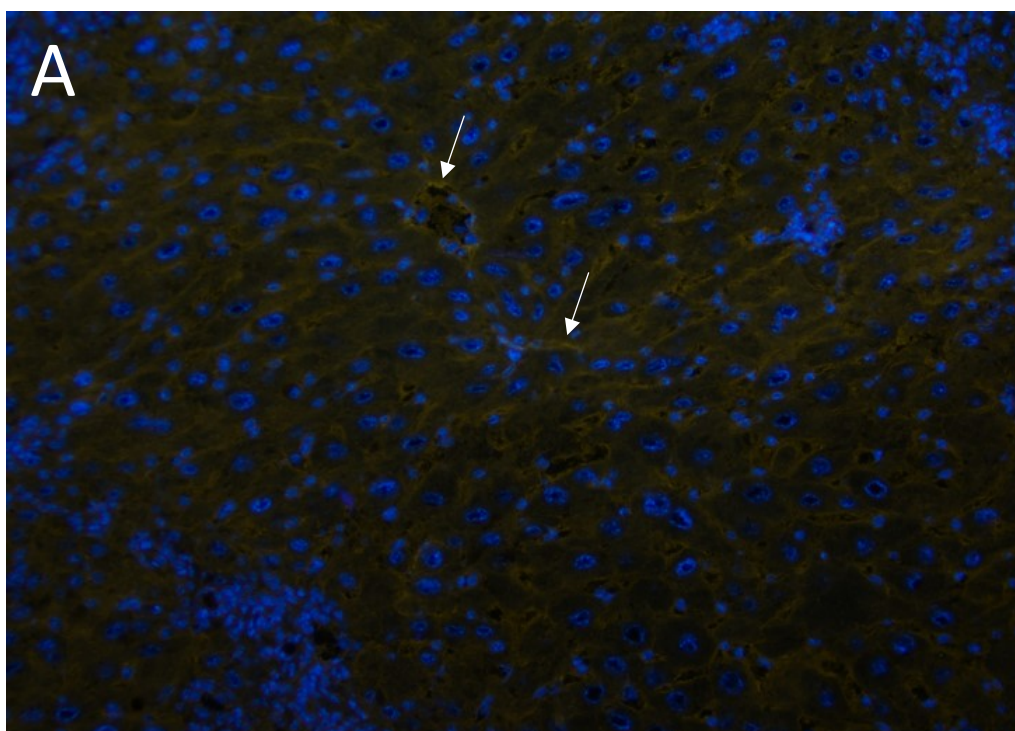
Obrázek 33: *Reprezentativní snímek detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1 u DDC skupiny. Slabá exprese endoglinu (červená barva, oranžové šipky) se nachází především v endotelu centrální žíly, zatímco exprese VCAM-1 je silná, a to zejména v oblastech žlučových kanálek (zelené šipky). Červeně svítí depozita porfyrinu (červené šipky). Zvětšení 400x.*

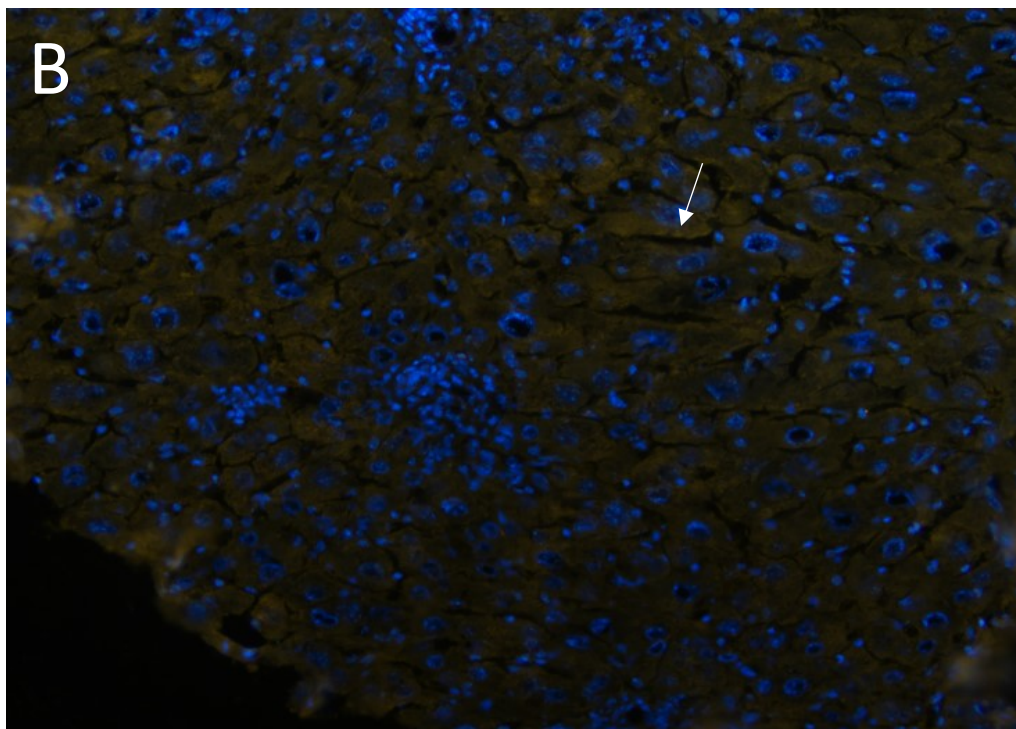


Obrázek 34: *Reprezentativní snímek detekce kolokalizace endoglinu a VCAM-1 u DDC/TRC105 skupiny. Pozorujeme podobný výsledek jako u DDC skupiny, VCAM-1 je značen zelenými, endoglin oranžovými a porfyrin červenými šipkami. Zvětšení 400x.*

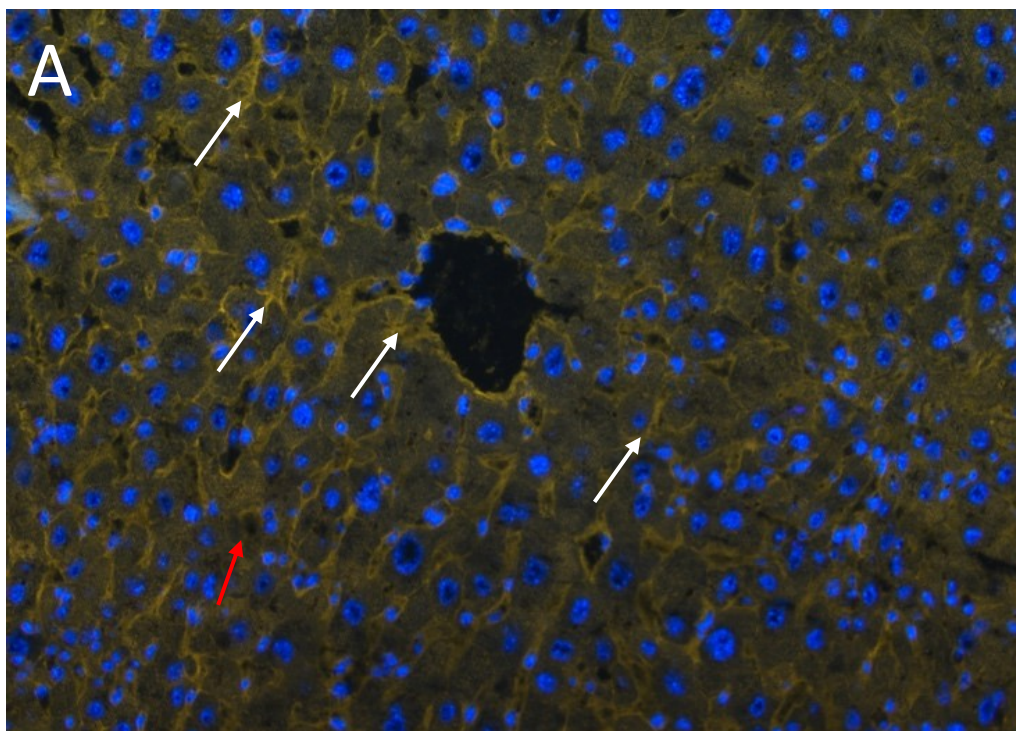
5.5 Reprezentativní snímky imunohistochemické detekce ICAM-1

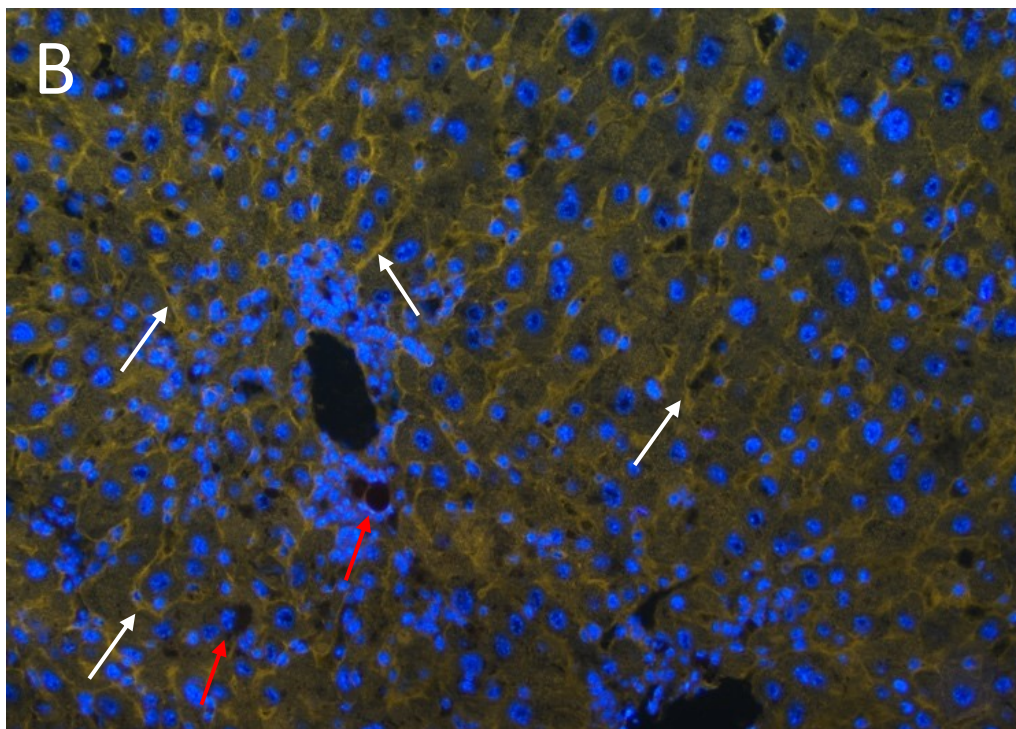
Imunofluorescenční analýza exprese ICAM-1 byla provedena na 36 sklíčkách po 2 řezech. U kontrolní skupiny byla exprese téměř nedekovatelná (obrázek 35 A, B). U vzorků jater poškozených DDC dietou byl patrný markantní nárůst exprese ICAM-1 zejména v endotelových buňkách centrální žíly a v sinusoidách (obrázek 36 A, B). Podobné změny byly pozorovány u DDC/TRC105 skupiny (obrázek 36 A, B).



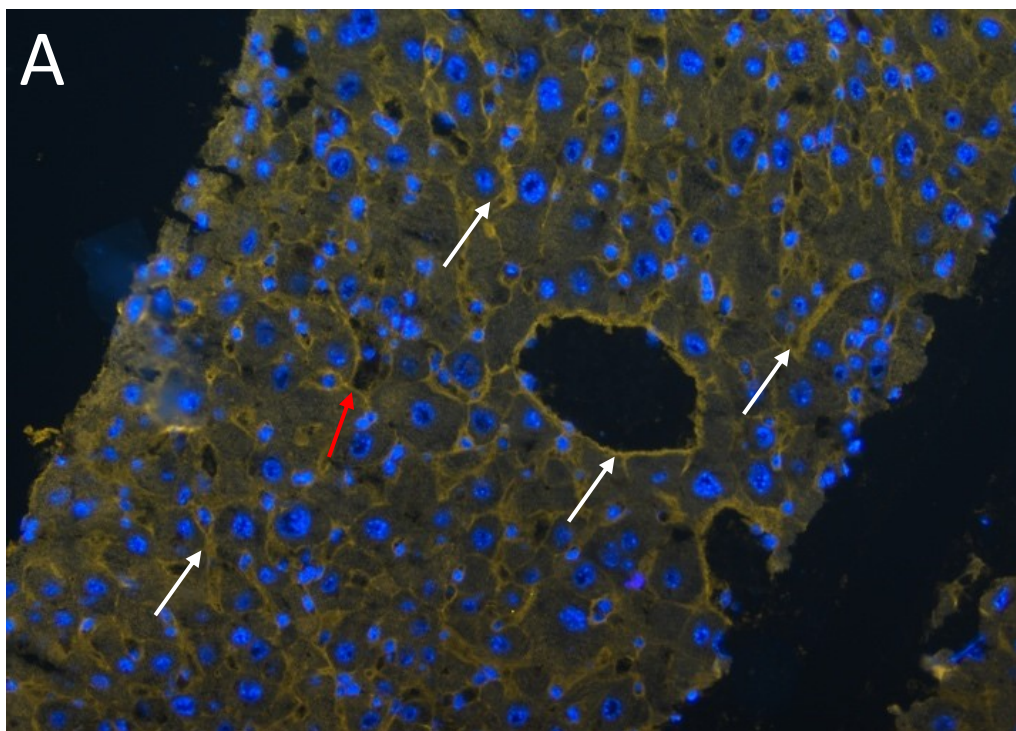


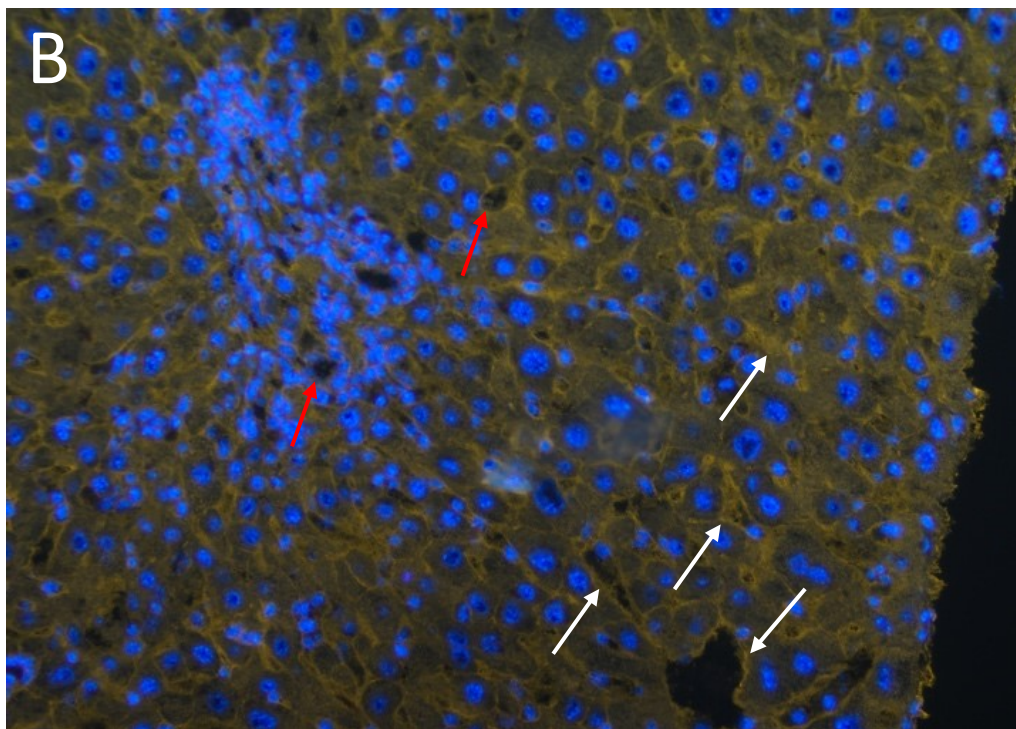
Obrázek 35: Reprezentativní snímky imunofluorescenční detekce ICAM-1 u kontrolní skupiny. Tento marker zánětu byl u vzorků zdravých jater detekován pouze velmi slabě (oranžová barva, bílé šipky). Zvětšení 200x (A i B).





Obrázek 36: Reprezentativní snímek imunofluorescenční detekce ICAM-1 u DDC skupiny. Exprese je oproti kontrolní skupině výrazně vyšší, a to zejména v endotelových buňkách sinusoid a centrální žíly (oranžová barva, bílé šipky). Depozita porfyrinového pigmentu jsou označena červenými šipkami. Zvětšení 200x (A i B).





Obrázek 37: Reprezentativní snímek imunofluorescenční detekce ICAM-1 u DDC/TRC105 skupiny. Byly pozorovány velmi podobné změny oproti kontrolní skupině jako u DDC skupiny. ICAM-1 je znázorněn bílými šipkami, porfyrinový pigment červenými šipkami. Zvětšení 200x (A i B).

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo analyzovat expresi endoglinu a buněčných adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 v játrech experimentálního myšího modelu jaterní fibrózy, a zhodnocení vlivu souběžného podávání monoklonální protilátky carotuximabu, která blokuje působení endoglinu.

Endoglin je transmembránový glykoprotein, který je součástí TGF- β receptorového komplexu, a který moduluje TGF- β signalizaci [5] [18]. Působením tzv. matrix metaloproteináz může být extracelulární část endoglinu štěpena za vzniku solubilního endoglinu, který je uvolňován do cirkulace, a který může být detekován jakožto biomarker patologických stavů souvisejících s metabolickým syndromem [44]. Endoglin je exprimován endotelovými buňkami, hladkosvalovými buňkami cév [39], fibroblasty [42], aktivovanými makrofágy [40] a jaterními hvězdovitými buňkami [41]. Změny v jeho expresi a funkci jsou spojeny s některými patologickými stavy, jako je hereditární hemoragická telenagiektázie [54], angiogeneze spojená s nádorovým bujením, fibróza [6], endotelová dysfunkce [44] a zánět [45].

V současné době není přesně známa úloha endoglinu v patologii jater. Zvýšená exprese endoglinu v játrech je asociována především s jaterní fibrózou [6] [18]. Jedním z důkazů je například studie, kdy při izolaci aktivovaných hvězdovitých buněk ze dvou *in vivo* modelů jaterní fibrózy, která vznikla jako důsledek podvázání žlučovéhoodu a podávání CCl₄, byla v těchto buňkách detekována zvýšená exprese endoglinu [6]. Dalším důkazem je například detekce endoglinu v játrech *in vivo* a kultivovaných portálních fibroblastech *in vitro*, které byly získány od pacientů s pokročilou jaterní fibrózou v důsledku infekce virem hepatitidy C [54] [58].

Intercelulární adhezní molekula ICAM-1 a vaskulární buněčná adhezní molekula VCAM-1 se nacházejí na endotelových a epitelových buňkách [19], ICAM-1 je dále exprimován fibroblasty, keratinocyty a leukocyty [8]. Exprese těchto buněčných adhezních molekul se zvyšuje během patologických stavů jako je zánět či endotelová dysfunkce, což vede ke zvýšené akumulaci leukocytů v místech zánětu, jaterní poškození nevyjímaje [19].

Chronické podávání krmiva obohaceného o DDC myším je často využívaný model cholestatického poškození jater. Vzhledem k tomu, že DDC je schopen indukovat chronický oxidační stres, je tento model specificky asociován s metabolickým poškozením jater, které se objevuje například u alkoholové a nealkoholové steatohepatitidy [97]. Cholestáza vyvolaná podáváním DDC vzniká v důsledku kumulace porfyrinového pigmentu a následné tvorby porfyrinových zátek, které se tvoří přibližně po čtyřech týdnech pravidelného podávání DDC,

a které vyvolávají obstrukci ve žlučovodech. Z těchto důvodů vede chronické podávání DDC k tvorbě periduktální fibrózy, která progreduje v čase [77] [78].

TRC105 (carotuximab) je monoklonální protilátka působící proti endoglinu, která v minulosti na experimentálním modelu jaterní fibrózy ještě nikdy testována nebyla.

V této diplomové práci, imunohistochemická analýza exprese endoglinu u vzorků jater kontrolní skupiny ukázala silnou expresi v endotelových buňkách sinusoid a dalších cév. Navzdory očekávání, podávání DDC dramaticky snížilo expresi endoglinu, ačkoli u těchto myší došlo k rozvoji fibrózy, která byla patrná ze zmnožení jader buněk produkujících extracelulární matrix v portobiliárních oblastech. Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozími publikovanými zjištěními, kdy bylo prokázáno zvýšení exprese endoglinu v játrech experimentálních modelů nealkoholové steatohepatitidy (NASH) v porovnání s kontrolní skupinou [98]. Vysvětlení by mohlo spočívat v tom, že v případě této práce se jednalo o cholestatický model indukovaný podáváním DDC. Jaterní fibróza tedy byla navozena odlišným stimulem, než tomu bylo ve výše zmíněné publikaci, kde byla experimentálním zvířatům podávána NASH dieta. Z tohoto poznatku můžeme usoudit, že endoglin se pravděpodobně nepodílí na procesu vzniku fibrózy u DDC zvířecího modelu. Podpurným faktem je i to, že podávání carotuximabu nemělo žádný vliv na expresi endoglinu vzhledem k tomu, že jeho expresi již byla snížena samotným podáváním DDC. Navíc rozvoj fibrózy byl obdobného rozsahu jak u DDC, tak u DDC/TRC105 skupiny. Cholestaticky indukovaná fibróza tedy pravděpodobně nemá souvislost s expresí endoglinu, a samotná expresi endoglinu je přímo snížena podáváním DDC, což je nový poznatek dosud nepublikovaný v dostupné literatuře.

Imunohistochemická analýza exprese VCAM-1 a ICAM-1 prokázala u kontrolní skupiny myší pouze slabou expresi. Jak je známo, jaterní poškození spouští zvýšenou expresi těchto adhezních molekul v endotelu, a de novo syntézu v hepatocytech a cholangiocytech [19]. V této diplomové práci DDC dieta signifikantně zvýšila expresi ICAM-1 zejména v endotelových sinusoidálních buňkách, ale nikoli v hepatocytech či cholangiocytech. Tyto výsledky naznačují, že následná expresi ICAM-1 se odvíjí od druhu jaterního poškození [19]. Můžeme tedy říci, že zvýšená expresi ICAM-1 v endotelových buňkách po podávání DDC má přímou souvislost s rozvojem zánětu a endotelovou sinusoidální dysfunkcí.

Je také známo, že zánětlivé cytokiny zvyšují expresi VCAM-1, a proto je u zánětlivých onemocnění jater expresi VCAM-1 na vaskulárních a sinusoidálních endotelových buňkách detekována ve zvýšené míře [19]. V této diplomové práci byla expresi VCAM-1 ve vzorcích

jater u kontrolních skupin nízká, respektive imunohistochemickou metodou v podstatě nedetekovatelná. U skupiny myši, kterým byl podáván DDC, překvapivě exprese VCAM-1 v endotelových sinusoidálních buňkách nebyla detekována, z čehož můžeme usoudit, že VCAM-1 pravděpodobně nemá vliv na rozvoj endotelové dysfunkce tak, jako to bylo prokázáno u ICAM-1. Na druhou stranu, silná exprese VCAM-1 byla detekována v cholangiocytech a oblastech portální fibrózy, což by mohlo být spojeno s adhezí $\alpha 4\beta 1$ -pozitivních jaterních T-buněk na cholangiocyty. Tato adheze, která je zprostředkována skrze VCAM-1, vede k redukci apoptózy T-buněk, a tím tedy napomáhá jejich přežívání a v důsledku podporuje zánět v játrech [65].

Součástí této práce bylo zhodnocení případné koexprese endoglinu a VCAM-1, protože u obou z nich byla v různých podmínkách prokázána souvislost s rozvojem zánětu a transmigrací leukocytů [45]. Výsledky této práce ukazují, že ve vzorcích jater těchto tří skupin experimentálních zvířat nebyla přítomna žádná kolokalizace endoglinu s VCAM-1. Domníváme se, že tento výsledek má vztah konkrétně k DDC modelu jaterní fibrózy, a nemusí být relevantní pro jiné etiologie jaterního poškození.

Podávání TRC105 nemělo vliv na lokalizaci a intenzitu exprese ICAM-1 ani VCAM-1. Nicméně studie dokládají, že carotuximab podporuje prozánětlivé reakce v nádorech [99]. Avšak vzhledem k tomu, že hlavní cíl působení carotuximabu – endoglin – byl již snížen samotným podáváním DDC diety, nebylo možné zhodnotit vliv carotuximabu.

7 Závěr

Mezi cíle této diplomové práce patřila analýza změn exprese endoglinu a markerů zánětu ICAM-1 a VCAM-1, a objasnění vlivu souběžného podávání carotuximabu na expresi těchto markerů a rozvoj fibrózy, která byla vyvolána podáváním DDC. Výsledky této diplomové práce ukazují, že DDC dieta indukovala rozvoj jaterní fibrózy a zánětu, a to bez účasti endoglinu. Zánět byl u DDC i DDC/TRC105 skupiny potvrzen zvýšenou expresí ICAM-1 v endotelových buňkách a VCAM-1 v cholangiocytech. Rozvoj fibrózy byl podložen zvýšením hustoty jader buněk produkující proteiny extracelulární matrix v portobiliárních oblastech u DDC a DDC/TRC105 skupiny oproti kontrolní skupině.

Zvýšenou expresi endoglinu u kontrolní skupiny oproti DDC a DDC/TRC105 skupině vysvětlujeme tím, že DDC dieta přímo snižuje expresi endoglinu, a to bez ohledu na fibrotické poškození. Podávání carotuximabu u DDC modelu jaterní fibrózy tedy nemělo vliv na rozvoj fibrózy ani zánětu, neboť již samotná DDC dieta expresi endoglinu snížila. Z tohoto důvodu nepovažujeme DDC zvířecí model jako vhodný pro studium efektu carotuximabu, a pro budoucí studium vlivu carotuximabu na rozvoj jaterní fibrózy bude nezbytné využít jiný experimentální model. Cíle této diplomové práce tedy byly naplněny pouze částečně, protože zhodnocení vlivu carotuximabu na expresi endoglinu nebylo možné provést.

8 Seznam použitých zkratk

zkratka	anglický význam	český význam
ABC	avidin-biotin complex	avidin-biotin komplex
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole	3-amino-9-ethylkarbazol
ALK	activin receptor-like kinase	kináza podobná receptoru pro aktivin
Alms1	Alström syndrome gene 1	gen Alströмова syndromu 1
ALT	alanine aminotransferase	alaninaminotransferáza
αSMA	α -smooth muscle actin	α -aktin hladkého svalu
AST	aspartate aminotransferase	aspartátaminotransferáza
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	5-brom-4-chlor-3-indolyl-fosfát
BMP	bone morphogenic protein	kostní morfogenetický protein
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CAF	cancer-associated fibroblasts	fibroblasty asociované s nádorem
CAM	cell adhesion molecules	buněčné adhezní molekuly
CCl₄	carbon tetrachloride	tetrachlormethan
CD	cytoplasmic domain	cytoplazmatická doména
CD54/105/106	cluster of differentiation	diferenciační skupina
CDAА diet	choline-deficient L-amino-defined diet	cholin-deficitní a L-aminokyselinami definovaná dieta
CH	constant heavy	konstantní podjednotka těžkého řetězce
CL	constant light	konstantní podjednotka lehkého řetězce
CTGF	connective tissue growth factor	růstový faktor pojivové tkáně
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand	chemokinový ligand s C-X-C motivem
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor	chemokinový receptor s C-X-C motivem
CYT domain	cytoplasmic domain	cytoplazmatická doména
DAB	3,3'-diaminobenzidine	3,3'-diaminobenzidin
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane	1,4-diazobicyklo[2.2.2]oktan
DAG	diacylglycerol	diacylglycerol
DAPI	4'-6-diamidine-2-phenyl indole	4',6-diamidin-2-fenylindol

DDC	3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-collidine	3,5-diethoxykarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-kolidin
DIAMOND	diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease	dietou indukovaný zvířecí model nealkoholového ztučnění jater
DM1/2	diabetes mellitus type 1/2	diabetes mellitus 1. nebo 2. typu
EC	endothelial cells	endotelové buňky
EC domain	extracelullar domain	extracelulární doména
ECM	extracellular matrix	extracelulární matrix
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelová syntáza oxidu dusnatého
Fab	antigen binding fragment	fragment vázající antigen
Fc	crystallizable fragment	krystalizující fragment
FXR	farnesoid X receptor	farnesoidní X receptor
GLP-1	glucagon-like peptide	glukagonu podobný peptid
HDL	high-density lipoprotein	lipoprotein s vysokou hustotou
Her2	human epidermal growth factor receptor 2	humánní receptor typu 2 pro epidermální růstový faktor
HFD	high-fat diet	dieta s vysokým obsahem tuku
HHT	hereditary hemorrhagic telangiectasia	hereditární hemoragická teleangiektázie
HIER	heat induced epitope retrieval	teplem indukované odmaskování epitopu
HRP	horseradish peroxidase	křenová peroxidáza
HSC	hepatic stellate cells	jaterní hvězdčicovité buňky
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	intercelulární adhezní molekula 1
Id 1	inhibitor of differentiation 1	inhibitor diferenciace 1
IFN-γ	interferon γ	interferon γ
Ig	immunoglobulin	imunoglobulin
IgCAM	immunoglobulin cell adhesion molecules	buněčné adhezní molekuly z rodiny imunoglobulinů
IL-1β	interleukin-1 β	interleukin-1 β
JAM	junction adhesion molecule	junkční adhezní molekula
LADA	latent autoimmune diabetes of adults	latentní autoimunitní diabetes dospělých
LAP	latency-associated peptide	-

LDL	low-density lipoprotein	lipoprotein s nízkou hustotou
LSB	labeled streptavidin binding	vazba značená streptavidinem
MAdCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	mukozální adresinová buněčná adhezní molekula 1
MCD diet	methionine choline-deficient diet	methionin a cholin-deficientní dieta
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1	monocytární chemoatraktivní protein 1
MMP	matrix metalloproteinase	matrixová metaloproteináza
MODY	maturity-onset diabetes of the young	diabetes mladistvých připomínající DM2
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	nealkoholové ztučnění jater
NASH	non-alcoholic steatohepatitis	nealkoholová steatohepatitida
NBT	nitro blue tetrazolium	nitrotetrazoliová modř
NCAM	neural cell adhesion molecule	adhezní molekula nervových buněk
NK buňky	natural killer cells	přírození zabíječi
PAP	peroxidase-antiperoxidase	peroxidáza-antiperoxidáza
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
PD-1	programed cell death receptor 1	receptor programované buněčné smrti 1
PDGF	platelet derived growth factor	destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1	adhezní molekula krevních destiček a endotelových buněk 1
PIER	proteolytic induced epitope retrieval	proteolyticky indukované odmaskování epitopu
RGD	arginylglycylaspartic acid	arginin-glycin-aspartát
sEng	soluble endoglin	solubilní endoglin
SMAD	small mothers against decapentaplegic	-
TAA	thioacetamide	thioacetamid
TAG	triacylglycerol	triacylglycerol
TβRI/II	TGF-β receptor type I/II	receptor typu I/II pro TGF-β
TGF-β	transforming growth factor β	transformující růstový faktor β
TGR5	G protein-coupled bile acid receptor	receptor žlučových kyselin spřažený s G-proteinem

TM domain	transmembrane domain	transmembránová doména
TNF-α	tumor necrosis factor α	tumor nekrotizující faktor α
VAP-1	vascular adhesion protein 1	vaskulární adhezní protein 1
VCAM	vascular cell adhesion molecule 1	vaskulární buněčná adhezní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2	receptor vaskulárního endotelového růstového faktoru
VH	variable heavy	variabilní podjednotka těžkého řetězce
VL	variable light	variabilní podjednotka lehkého řetězce
VLDL	very-low-density lipoprotein	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
ZP domain	zona pellucida domain	doména zóna pellucida

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Znázornění jaterního lalůčku	12
Obrázek 2: Grafické znázornění tří funkčně-strukturálních jednotek jater	13
Obrázek 3: Grafické znázornění histologie jaterního lalůčku	13
Obrázek 4: Zjednodušené znázornění patogeneze jaterní fibrózy	17
Obrázek 5: Progrese fibrózy u NASH	18
Obrázek 6: Struktura endoglinu.....	23
Obrázek 7: Role endotelového endoglinu při extravazaci leukocytů	25
Obrázek 8: BMP-9 signální dráha	27
Obrázek 9: Přehled interakcí mezi hepatocyty a CAM během zánětu a fibrózy	30
Obrázek 10: Porovnání vzhledu porfyrinového a žlučového pigmentu	35
Obrázek 11: Struktura DDC	36
Obrázek 12: Grafické znázornění struktury monoklonální protilátky	37
Obrázek 13: TGF- β signalizační kaskáda v endotelových buňkách.....	38
Obrázek 14: Carotuximabem inhibovaná vazba BMP-9 na endoglin	39
Obrázek 15: Interakce mezi endoglinem a VEGFR-2	40
Obrázek 16: Rozdíl mezi přímou a nepřímou detekcí	44
Obrázek 17: Rozdíl mezi přímou a nepřímou imunofluorescencí.....	45
Obrázek 18: ABC metoda.....	46
Obrázek 19: Protokol pro barvení olejovou červení.....	49
Obrázek 20: Protokol pro enzymatickou imunohistochemii	51
Obrázek 21: Protokol pro fluorescenční imunohistochemii	53
Obrázek 22: Protokol pro fluorescenční imunohistochemickou detekci ICAM-1	54
Obrázek 23: Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny.....	55
Obrázek 24: Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u DDC skupiny	56
Obrázek 25: Reprezentativní snímek barvení olejovou červení u DDC/TRC105 skupiny	56
Obrázek 26: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u kontrolní skupiny	58
Obrázek 27: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u DDC skupiny	59
Obrázek 28: Reprezentativní snímky detekce endoglinu u DDC/TRC105 skupiny	60
Obrázek 29: Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u kontrolní skupiny.....	61
Obrázek 30: Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u DDC skupiny	62
Obrázek 31: Reprezentativní snímky detekce VCAM-1 u DDC/TRC105 skupiny	63
Obrázek 32: Reprezentativní snímek detekce kolokalizace u kontrolní skupiny	64

Obrázek 33: Reprezentativní snímek detekce kolokalizace u DDC skupiny	65
Obrázek 34: Reprezentativní snímek detekce kolokalizace u DDC/TRC105 skupiny	65
Obrázek 35: Reprezentativní snímky detekce ICAM-1 u kontrolní skupiny	67
Obrázek 36: Reprezentativní snímek detekce ICAM-1 u DDC skupiny.....	68
Obrázek 37: Reprezentativní snímek detekce ICAM-1 u DDC/TRC105 skupiny.....	69

10 Použitá literatura

- [1] YOUNOSSI, Zobair M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *Journal of Hepatology*. 2019, **70**(3), 531-544. ISSN 01688278.
- [2] ANGULO, Paul, David E. KLEINER, Sanne DAM-LARSEN, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015, **149**(2), 389-397.e10. ISSN 00165085.
- [3] BYRNE, Christopher D. a Giovanni TARGHER. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. 2015, **62**(1), S47-S64. ISSN 01688278.
- [4] TARGHER, Giovanni, Kathleen E. COREY, Christopher D. BYRNE a Michael RODEN. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus – mechanisms and treatments. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021, **18**(9), 599-612. ISSN 1759-5045.
- [5] BERNABEU, Carmelo, Jose M. LOPEZ-NOVOA a Miguel QUINTANILLA. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009, **1792**(10), 954-973. ISSN 09254439.
- [6] ALSAMMAN, Muhammad, Viktor STERZER, Steffen K. MEURER, et al. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis-A protective factor against liver fibrosis. *Liver International*. 2018, **38**(5), 858-867. ISSN 14783223.
- [7] WIERCINSKA, Eliza, Lucia WICKERT, Bernd DENECKE, et al. Id1 is a critical mediator in TGF- β -induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2006, **43**(5), 1032-1041. ISSN 02709139.
- [8] HARJUNPÄÄ, Heidi, Marc LLORT ASENS, Carla GUENTHER a Susanna C. FAGERHOLM. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2019, **10**. ISSN 1664-3224.
- [9] NOLAN-STEVAUX, Olivier, Wendy ZHONG, Stacey CULP, Kathy SHAFFER, Joseph HOOVER, Dineli WICKRAMASINGHE, Astrid RUEFLI-BRASSE a Maurizio PESCE. Endoglin Requirement for BMP9 Signaling in Endothelial Cells Reveals New Mechanism of Action for Selective Anti-Endoglin Antibodies. *PLoS ONE*. 2012, **7**(12). ISSN 1932-6203.

- [10] PAAUWE, M, R C HEIJKANTS, C H OUDT, et al. Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*. 2016, **35**(31), 4069-4079. ISSN 0950-9232.
- [11] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Vyd. 7. Jinočany, 1997. s. 303-317. ISBN 80-857-8737-7.
- [12] WISSE, Eddie, Dianzhong LUO, David VERMIJLEN, Chryssa KANELLOPOULOU, Ronald DE ZANGER a Filip BRAET. On the Function of Pit Cells, the Liver-Specific Natural Killer Cells. *Seminars in Liver Disease*. 1997, **17**(04), 265-286. ISSN 0272-8087.
- [13] FONTANA, Josef, Martina ŠAJDÍKOVÁ a Patrik MAĎA. Játra a biotransformace xenobiotik. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>
- [14] FREVERT, Ute, Sabine ENGELMANN, Sergine ZOUGBÉDÉ, et al. Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver. *PLoS Biology*. 2005, **3**(6). ISSN 1545-7885.
- [15] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. s. 372-375. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [16] SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Color atlas of physiology*. 6th ed. Stuttgart: Thieme. 2009. s. 256. ISBN 978-3-13-545006-3.
- [17] UTZSCHNEIDER, Kristina M, Steven E KAHN a David C POLIDORI. Hepatic Insulin Extraction in NAFLD Is Related to Insulin Resistance Rather Than Liver Fat Content. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019, **104**(5), 1855-1865. ISSN 0021-972X.
- [18] FINNISON, Kenneth W. a Anie PHILIP. Endoglin in liver fibrosis. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2012, **6**(1), 1-4. ISSN 1873-9601.
- [19] HINTERMANN a CHRISTEN. The Many Roles of Cell Adhesion Molecules in Hepatic Fibrosis. *Cells*. 2019, **8**(12). ISSN 2073-4409.
- [20] IPSEN, David H, Jens LYKKESFELDT a Pernille TVEDEN-NYBORG. Animal Models of Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: Do They Reflect Human Disease?. *Advances in Nutrition*. 2020, **11**(6), 1696-1711. ISSN 2161-8313.
- [21] KISSELEVA, Tatiana. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology*. 2017, **65**(3), 1039-1043. ISSN 02709139.

- [22] XU, Jun, Xiao LIU, Yukinori KOYAMA, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Frontiers in Pharmacology*. 2014, **5**. ISSN 1663-9812.
- [23] WALLACE, Michael, Scott FRIEDMAN a Derek MANN. Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Seminars in Liver Disease*. 2015, **35**(02), 107-118. ISSN 0272-8087.
- [24] KLEINER, David E. a Hala R. MAKHLOUF. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clinics in Liver Disease*. 2016, **20**(2), 293-312. ISSN 10893261.
- [25] KARSDAL, M.A., S.H. NIELSEN, D.J. LEEMING, et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017, **121**, 43-56. ISSN 0169409X.
- [26] THABUT, Dominique a Vijay SHAH. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension?. *Journal of Hepatology*. 2010, **53**(5), 976-980. ISSN 01688278.
- [27] TUGUES, Sònia, Guillermo FERNANDEZ-VARO, Javier MUÑOZ-LUQUE, et al. Antiangiogenic treatment with Sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2007, **46**(6), 1919-1926. ISSN 02709139.
- [28] PRUHOVA, S., J. EK, J. LEBL, Z. SUMNIK, F. SAUDEK, M. ANDEL, O. PEDERSEN a T. HANSEN. Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4 α , GCK and HNF-1 α . *Diabetologia*. 2003, **46**(2), 291-295. ISSN 0012-186X.
- [29] MUSIL, František. Pankreatogenní diabetes. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, **10**(4) [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/int/2008/04/02.pdf>
- [30] VLČEK, Jiří, Daniela FIALOVÁ a Magda VYTRŽÍŠALOVÁ. *Klinická farmacie*. Praha: Grada, 2014. s. 187-194. ISBN 978-80-247-3169-8
- [31] MANTOVANI, Alessandro, Eleonora SCORLETTI, Antonella MOSCA, Anna ALISI, Christopher D. BYRNE a Giovanni TARGHER. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2020, **111**. ISSN 00260495.
- [32] MANTOVANI, Alessandro, Graziana PETRACCA, Giorgia BEATRICE, Herbert TILG, Christopher D BYRNE a Giovanni TARGHER. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident diabetes mellitus: an updated meta-analysis of 501 022 adult individuals. *Gut*. 2021, **70**(5), 962-969. ISSN 0017-5749.

- [33] HALLSWORTH, Kate a Leon A. ADAMS. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures. *JHEP Reports*. 2019, **1**(6), 468-479. ISSN 25895559.
- [34] LINDSTRÖM, Jaana, Pirjo ILANNE-PARIKKA, Markku PELTONEN, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *The Lancet*. 2006, **368**(9548), 1673-1679. ISSN 01406736.
- [35] SUNG, Ki-Chul, Sarah H. WILD a Christopher D. BYRNE. Resolution of Fatty Liver and Risk of Incident Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013, **98**(9), 3637-3643. ISSN 0021-972X.
- [36] HAN, Chang. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(7). ISSN 1422-0067.
- [37] KIM, Hyeonhui a Sungsoon FANG. Crosstalk between FXR and TGR5 controls glucagon-like peptide 1 secretion to maintain glycemic homeostasis. *Laboratory Animal Research*. 2018, **34**(4). ISSN 1738-6055.
- [38] RODEN, Michael a Gerald I. SHULMAN. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. 2019, **576**(7785), 51-60. ISSN 0028-0836.
- [39] LOPEZ-NOVOA, J.M. a C. BERNABEU. Endoglin. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [online]. Madrid, 2012 [cit. 2022-03-16]. Dostupné z: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40452/eng-\(endoglin\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40452/eng-(endoglin))
- [40] LASTRES, Pedro, Teresa BELLON, Carlos CABAÑAS, Francisco SANCHEZ-MADRID, Agustin ACEVEDO, Anne GOUGOS, Michelle LETARTE a Carmelo BERNABEU. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *European Journal of Immunology*. 1992, **22**(2), 393-397. ISSN 00142980.
- [41] MEURER, Steffen K., Lidia TIHAA, Erawan BORKHAM-KAMPHORST a Ralf WEISKIRCHEN. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling*. 2011, **23**(4), 683-699. ISSN 08986568.
- [42] GUERRERO-ESTEO, Mercedes, Pedro LASTRES, Ainhoa LETAMENDÍA, et al. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*. 1999, **78**(9), 614-623. ISSN 01719335.
- [43] DALLAS, Nikolaos A., Shaija SAMUEL, Ling XIA, Fan FAN, Michael J. GRAY, Sherry J. LIM a Lee M. ELLIS. Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature

- and Potential Target for Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2008, **14**(7), 1931-1937. ISSN 1078-0432.
- [44] VICEN, Matej, Barbora VITVEROVA, Radim HAVELEK, et al. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro. *The FASEB Journal*. 2019, **33**(5), 6099-6114. ISSN 0892-6638.
- [45] ROSSI, Elisa, Francisco SANZ-RODRIGUEZ, Nelida ELEN0, et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. 2013, **121**(2), 403-415. ISSN 0006-4971.
- [46] GOUGOS A, M. LETARTE. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990, **265**(15), 8361-8364.
- [47] BLANCO, Francisco J., María T. GRANDE, Carmen LANGA, et al. S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. *Circulation Research*. 2008, **103**(12), 1383-1392. ISSN 0009-7330.
- [48] ARISTORENA, Mikel, Eunáte GALLARDO-VARA, Matej VICEN, et al. MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(12). ISSN 1422-0067.
- [49] VICEN, Matej, Ivone Cristina IGREJA SÁ, Katarína TRIPSKÁ, Barbora VITVEROVÁ, Iveta NAJMANOVÁ, Samira EISSAZADEH, Stanislav MICUDA a Petr NACHTIGAL. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021, **78**(6), 2405-2418. ISSN 1420-682X.
- [50] BI, Jianjun a Shengfang GE. Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(11), 20656-20667. ISSN 1422-0067.
- [51] BLÁZQUEZ-MEDELA, Ana M, Luis GARCÍA-ORTIZ, Manuel A GÓMEZ-MARCOS, José I RECIO-RODRÍGUEZ, Angel SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, José M LÓPEZ-NOVOA a Carlos MARTÍNEZ-SALGADO. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Medicine*. 2010, **8**(1). ISSN 1741-7015.
- [52] LEBRIN, Franck, Marie-José GOUMANS, Leon JONKER, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*. 2004, **23**(20), 4018-4028. ISSN 0261-4189.
- [53] SANZ-RODRIGUEZ, Francisco, Mercedes GUERRERO-ESTEO, Luisa-Maria BOTELLA, Denis BANVILLE, Calvin P.H. VARY a Carmelo BERNABÉU.

- Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(31), 32858-32868. ISSN 00219258.
- [54] MEURER, S.K., M. ALSAMMAN, D. SCHOLTEN, R. WEISKIRCHEN. Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World J Biol Chem*. 2014. **5**(2):180-203.
- [55] ANDERBERG, Charlotte, Sara I. CUNHA, Zhenhua ZHAI, et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *Journal of Experimental Medicine*. 2013, **210**(3), 563-579. ISSN 1540-9538.
- [56] LEAÑOS-MIRANDA, Alfredo, Claudia Stephanny NAVARRO-ROMERO, Liliana Janet SILLAS-PARDO, Karla Leticia RAMÍREZ-VALENZUELA, Irma ISORDIA-SALAS a Luis Manuel JIMÉNEZ-TREJO. Soluble Endoglin As a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes. *Hypertension*. 2019, **74**(4), 991-997. ISSN 0194-911X.
- [57] MUÑOZ-FÉLIX, José M., María GONZÁLEZ-NÚÑEZ a José M. LÓPEZ-NOVOA. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: Friend or foe?. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2013, **24**(6), 523-537. ISSN 13596101.
- [58] CLEMENTE, M., O. NUNEZ, R. LORENTE, et al. Increased intrahepatic and circulating levels of endoglin, a TGF- β 1 co-receptor, in patients with chronic hepatitis C virus infection: relationship to histological and serum markers of hepatic fibrosis. *Journal of Viral Hepatitis*. 2006, **13**(9), 625-632. ISSN 1352-0504.
- [59] GARRIDO-URBANI, Sarah, Paul F. BRADFIELD, Boris P.-L. LEE a Beat A. IMHOF. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochemical Society Transactions*. 2008, **36**(2), 203-211. ISSN 0300-5127.
- [60] CAVALLARO, Ugo a Elisabetta DEJANA. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011, **12**(3), 189-197. ISSN 1471-0072.
- [61] GOODWIN, Marita a Alpha S. YAP. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *Journal of Molecular Histology*. 2004, **35**(8-9), 839-844. ISSN 1567-2379.
- [62] CHO, Il Je, Young Woo KIM, Chang Yeob HAN, et al. E-cadherin antagonizes transforming growth factor β 1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting

- RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology*. 2010, **52**(6), 2053-2064. ISSN 02709139.
- [63] KLINGBERG, Franco, Melissa L. CHOW, Anne KOEHLER, et al. Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF- β 1 for activation. *Journal of Cell Biology*. 2014, **207**(2), 283-297. ISSN 1540-8140.
- [64] MUHANNA, Nidal, Sarit DORON, Ori WALD, Amjad HORANI, Ahmed EID, Orit PAPPO, Scott L. FRIEDMAN a Rifaat SAFADI. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology*. 2008, **48**(3), 963-977. ISSN 02709139.
- [65] AFFORD, Simon C., Elizabeth H. HUMPHREYS, Danielle T. REID, et al. Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis. *Hepatology*. 2014, **59**(5), 1932-1943. ISSN 02709139.
- [66] WOODFIN, Abigail, Mathieu-Benoit VOISIN a Sussan NOURSHARGH. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, **27**(12), 2514-2523. ISSN 1079-5642.
- [67] LIBBRECHT, Louis, David CASSIMAN, Valeer DESMET a Tania ROSKAMS. Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochemistry and Cell Biology*. 2001, **116**(3), 233-239. ISSN 0948-6143.
- [68] HINTERMANN, Edith, Monika BAYER, Clara Benedetta CONTI, et al. Junctional adhesion molecules JAM-B and JAM-C promote autoimmune-mediated liver fibrosis in mice. *Journal of Autoimmunity*. 2018, **91**, 83-96. ISSN 08968411.
- [69] VAN HERCK, Mikhaïl, Luisa VONGHIA a Sven FRANQUE. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients*. 2017, **9**(10). ISSN 2072-6643.
- [70] MATSUZAWA, Naoto, Toshinari TAKAMURA, Seiichiro KURITA, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007, **46**(5), 1392-1403. ISSN 02709139.
- [71] ASGHARPOUR, Amon, Sophie C. CAZANAVE, Tommy PACANA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology*. 2016, **65**(3), 579-588. ISSN 01688278.
- [72] FARRELL, Geoff, Jörn M. SCHATTEBERG, Isabelle LECLERCQ, Matthew M. YEH, Robert GOLDIN, Narci TEOH a Detlef SCHUPPAN. Mouse Models of

- Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019, **69**(5), 2241-2257. ISSN 0270-9139.
- [73] MATSUMOTO, Masahiko, Natsuko HADA, Yoshiyuki SAKAMAKI, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal of Experimental Pathology*. 2013, **94**(2), 93-103. ISSN 0959-9673.
- [74] TSUCHIDA, Takuma, Youngmin A. LEE, Naoto FUJIWARA, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *Journal of Hepatology*. 2018, **69**(2), 385-395. ISSN 01688278.
- [75] LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008, **51**(2), 216-226. ISSN 0012-186X.
- [76] YANG, J., H. OKABE a S.P. MONGA. Liver Development, Regeneration, and Stem Cells. *Pathobiology of Human Disease*. Elsevier. 2014. s. 1783-1799. ISBN 9780123864574.
- [77] GREAVES, Peter. Liver and Pancreas. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*. Elsevier. 2012. s. 433-535. ISBN 9780444538567.
- [78] POSE, Elisa, Pau SANCHO-BRU a Mar COLL. 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Diet: A Rodent Model in Cholestasis Research. VINKEN, Mathieu, ed. *Experimental Cholestasis Research*. New York, NY: Springer New York, 2019, 2019-04-24, s. 249-257. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-9419-9.
- [79] Diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate. *Merck*. [online]. [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/137030>
- [80] TIAN, Hongyu, Jennifer J. HUANG, Christelle GOLZIO, Xia GAO, Melissa HECTOR-GREENE, Nicholas KATSANIS a Gerard C. BLOBE. Endoglin interacts with VEGFR2 to promote angiogenesis. *The FASEB Journal*. 2018, **32**(6), 2934-2949. ISSN 0892-6638.
- [81] MILETÍN, Miroslav. Monoklonální protilátky: Struktura, mechanismy účinku, modifikace. *Biologická léčiva* [přednáška]. Farmacie. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy. 11. prosince 2019. [cit. 2022-03-13].
- [82] PAAUWE, Madelon, Peter TEN DIJKE a Lukas JAC HAWINKELS. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013, **17**(4), 421-435. ISSN 1472-8222.

- [83] NAGY, Janice A., Ann M. DVORAK a Harold F. DVORAK. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2007, **2**(1), 251-275. ISSN 1553-4006.
- [84] LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(1). ISSN 1422-0067.
- [85] SCHOONDERWOERD, Mark J.A., Maaïke F.M. KOOPS, Ricardo A. ANGELA, et al. Targeting Endoglin-Expressing Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment Enhances the Effect of PD1 Checkpoint Inhibitor Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2020, **26**(14), 3831-3842. ISSN 1078-0432.
- [86] TRACON Pharmaceuticals Announces Termination Of Phase 3 TAPPAS Trial Based On The Recommendation Of The Independent Data Monitoring Committee. *TRACON Pharmaceuticals* [online]. 12 April 2019 [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://traconpharma.gcs-web.com/news-releases/news-release-details/tracon-pharmaceuticals-announces-termination-phase-3-tappas>
- [87] Santen and TRACON Discontinue Development of DE-122 for Wet Age-Related Macular Degeneration. *Biospace* [online]. 09 March 2020 [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://www.biospace.com/article/releases/santen-and-tracon-discontinue-development-of-de-122-for-wet-age-related-macular-degeneration/>
- [88] Clinical Trials. *U. S. National Library of Medicine: ClinicalTrials.gov* [online]. [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=trc105&cntry=&state=&city=&dist=>
- [89] KHAMIS, Zahraa I., Ziad J. SAHAB a Qing-Xiang Amy SANG. Active Roles of Tumor Stroma in Breast Cancer Metastasis. *International Journal of Breast Cancer*. 2012, **2012**, 1-10. ISSN 2090-3170.
- [90] KAPUR, Navin K., Szuhuei WILSON, Adil A. YUNIS, et al. Reduced Endoglin Activity Limits Cardiac Fibrosis and Improves Survival in Heart Failure. *Circulation*. 2012, **125**(22), 2728-2738. ISSN 0009-7322.
- [91] NATH, Moushumi. Immunohistochemistry (IHC): Principles & Factors to Consider For Quality Results. *BenchSci* [online]. [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://blog.benchsci.com/immunohistochemistry-ihc-principles-factors-to-consider-for-quality-results>

- [92] IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC) PRINCIPLE: Everything You Need to Know About Immunohistochemistry (IHC) principle. *BOSTER: Antibody and ELISA experts* [online]. [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/immunohistochemistry-ihc-principle>
- [93] Secondary antibodies. *Stratech* [online]. [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/secondary-antibodies/>
- [94] Immunofluorescence. *LABSTER THEORY* [online]. [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://theory.labster.com/immunofluorescence-microscopy/>
- [95] Fluorophore table. *Abcam* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Fluorophore%20table.pdf>
- [96] Immunohistochemistry protocol - Avidin/Biotin Method (ABC). *Clini Sciences* [online]. [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://www.clinisciences.com/es/leer/immunohistochemistry-immunofluorescence-659/immunohistochemistry-protocol-avidin-2216.html>
- [97] MARIOTTI, Valeria, Mario STRAZZABOSCO, Luca FABRIS a Diego F. CALVISI. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018, **1864**(4), 1254-1261. ISSN 09254439.
- [98] IGREJA SÁ, Ivone Cristina, Katarina TRIPSKA, Milos HROCH, et al. 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*. 2020, **21**(23). ISSN 1422-0067.
- [99] LIU, Yingmiao, Mark D. STARR, John C. BRADY, et al. Modulation of circulating protein biomarkers following TRC 105 (anti-endoglin antibody) treatment in patients with advanced cancer. *Cancer Medicine*. 2014, **3**(3), 580-591. ISSN 2045-7634.