

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

HODNOCENÍ KVALITY PROTILÁTEK URČENÝCH PRO DETEKCI ENDOGLINU V JÁTRECH

Bc. ELIŠKA KEJZLAROVÁ

Vedoucí diplomové práce: Mgr. ZUZANA SVOBODOVÁ Ph.D.

Konzultant: M.Sc. Ivone Cristina Igreja e Sá

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí této práce Mgr. Zuzaně Svobodové Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při konzultacích, a také M.Sc. Ivone Cristina Igreja e Sá za veškerá doporučení, pomoc s experimenty a interpretací výsledků.

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

V Hradci Králové 2022

OBSAH

OBSAH.....	4
ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
ÚVOD	8
ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 Kardiovaskulární onemocnění	10
1.1.1 Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza	10
1.1.2 Hereditární hemoragická teleangiektázie	12
1.1.3 Fibróza srdečního myokardu	13
1.2 Játra.....	14
1.2.1 Metabolický syndrom	16
1.2.2 Nealkoholové ztučnění jater a nealkoholová steatohepatitida	17
1.2.3 Hepatocelulární karcinom	20
1.3 Endoglin.....	21
1.3.1 Nukleotidová sekvence dlouhé izoformy.....	22
1.3.2 Výskyt Endoglinu a jeho role ve fyziologickém stavu.....	23
1.3.3 Signalizace endoglinem a jeho ligandy	24
1.3.4 Endoglin a kardiovaskulární onemocnění	26
1.3.5 Role Endoglinu u nealkoholové steatohepatitidy	29
1.3.6 Endoglin a hepatocelulární karcinom	31
1.4 Protilátky	34
1.4.1 Vazba protilátek.....	35
1.4.2 Příprava protilátek	36
1.4.3 Imunodetekce.....	37
1.5 Dot blot – affiblot	37
1.6 Western blot	39

2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
2.1	Seznam použitých protilátek	41
2.1.1	Primární protilátky.....	41
2.1.2	Sekundární protilátky	41
2.2	Seznam použitých proteinů endoglinu	42
2.3	Seznam chemikálií	42
2.4	Seznam vybavení.....	43
2.5	Příprava použitých roztoků, pufrů a gelů.....	43
2.6	Metodika	45
2.6.1	Metoda affiblot.....	45
2.6.2	Metoda western blot.....	46
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE	50
3.1	Optimalizace affiblotu s lidským solubilním endoglinem	50
3.1.1	Kalibrační křivka.....	50
3.1.2	Testování optimálního ředění primární protilátky P4A4.....	51
3.2	Výběr anti-Eng protilátky pro detekci endoglinu na WB.....	53
3.2.1	Detekce mEng ve tkáni aorty a jater myšního původu metodou WB	53
3.2.2	Otestování anti-mEng protilátek na affiblotu	57
3.2.3	Testování afinity anti-eng protilátek.....	60
3.2.4	Ověření nespecifické sorpce sc-19793 a sekundárních protilátek	63
3.2.5	Testování vazby primární protilátky od Santa Cruz na BSA metodou WB.....	64
4.	ZÁVĚR	67
5.	SEZNAM ZKRATEK.....	71
6.	SEZNAM TABULEK	73
7.	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	76

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá endoglinem, transmembránovým glykoproteinem, který může být štěpen za vzniku tzv. solubilního endoglinu, jenž poté cirkuluje v krvi. V teoretické části práce jsou nejprve kapitoly věnující se kardiovaskulárním a jaterním onemocněním souvisejícím se změnami v expresi či hladině endoglinu v krvi, následují kapitoly shrnující dosavadní poznatky o tomto proteinu ve vztahu k různým onemocněním.

Cílem experimentální části práce bylo vybrat vhodnou protilátku proti endoglinu určenou pro western blot (WB). K dispozici byly celkem čtyři primární protilátky od tří výrobců. Účelem bylo protilátky otestovat a určit, která z nich má nejlepší schopnost detekovat endoglin ve vzorcích myší tkáně, jako jsou játra nebo aorta na WB.

Pro ověření jejich schopnosti vázat endoglin a také pro porovnání jejich afinit k tomuto proteinu byl použit affiblot. Nově vyvinuté a patentované zařízení fungujícího na bázi dot blotu. Vazba použitých protilátek na endoglin byla ověřena pomocí metody WB a poté byly výsledky obou metod porovnány. Ze získaných výsledků vyplynulo, že protilátka od Abcam má nejvhodnější parametry, co se týká specifity a citlivosti pro identifikaci endoglinu.

Klíčová slova: endoglin, solubilní endoglin, NASH, cirhóza, nealkoholová steatohepatitida, protilátka, affiblot

ABSTRACT

The diploma thesis deals with endoglin, a transmembrane glycoprotein that can be cleaved to form so-called soluble endoglin, which then circulates in the blood. The theoretical part of the thesis is devoted to cardiovascular and liver diseases related to changes in the expression or level of endoglin in the blood and summarizes current knowledge about endoglin and its relation to various diseases.

The experimental part of the thesis describes the selection of a suitable antibody against endoglin intended for western blot (WB). We have four anti-endoglin primary antibodies available from three manufacturers. The purpose was to test the antibodies and determine, which one had the best ability to detect endoglin in mouse tissue samples such as liver or aorta on WB.

Affiblot was used to verify their ability to bind endoglin and also to compare their affinities to this protein. Newly developed patented dot-blot-based device. The binding of the used antibodies to endoglin was verified using the WB method and then the results of both methods were compared. The obtained results showed that the Abcam antibody has the most suitable parameters regarding specificity and sensitivity for the identification of endoglin in mouse tissue on WB.

Keywords: endoglin, soluble endoglin, NASH, cirrhosis, non-alcoholic steatohepatitis, antibody, affiblot

ÚVOD

Endoglin je transmembránový glykoprotein s povrchovým znakem CD105, který funguje jako koreceptor pro ligandy nadrodiny transformujícího růstového faktoru β ^(1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9). V organismu se vyskytuje ve dvou formách, a to jako transmembránový protein, který je součástí cytoplazmatické membrány buněk nebo jako rozpustný neboli solubilní endoglin, který vzniká působením membránově vázaných enzymů – metaloproteáz na extracelulární část endoglinu ^(4; 7; 8).

Původně byl objeven na prekurzorových buňkách B-lymfocytů ⁽⁶⁾, později se prokázala jeho vysoká exprese na aktivovaných endoteliálních buňkách cév. Jeho přítomnost byla zaznamenána i na zralých buňkách vrozeného (makrofágy) a získaného (T-lymfocyty) imunitního systému, na buňkách jaterních, nádorových a také na fibroblastech ^(1; 2; 5; 6; 9; 10).

V organismu zastává různé funkce. Je důležitý pro správnou funkci endotelu, hraje významnou roli při regulaci angiogeneze, podílí se na správné struktuře cév, jejich integritě a významně se podílí na správném vývoji srdce ^(8; 9; 11). Uplatňuje se při zástavě krvácení, ale při jeho změněné expresi může dát vzniku zánětlivým či trombotickým změnám v cévách. Objevují se studie, které tvrdí, že endoglin produkovaný hvězdnicovými buňkami jater, má protektivní účinek proti fibrotizaci jater ⁽⁴⁾.

Abnormality v expresi endoglinu jsou spojovány s vaskulární dysfunkcí, jako je hereditární hemorhagická teleangiektázie 1 nebo preeklampsie ⁽⁶⁾. Solubilní endoglin je fyziologicky přítomen v krevním oběhu zdravých lidí, kam se uvolňuje z endoteliálních buněk. Za patologických stavů, jako je na příklad nádorová transformace, se může uvolňovat do krve ve zvýšeném množství právě z rakovinných buněk. Jeho hladina v krvi stoupá také při kardiovaskulárních a jaterních onemocněních ⁽⁴⁾.

ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce je shromáždit základní informace o endoglinu a jeho roli v lidském těle, shromáždit nejnovějších informace o jeho úloze v kardiovaskulárních onemocněních, játrech v souvislosti s fibrotizací jater a metabolickým syndromem, který může přejít v nealkoholovou steatohepatitidu. Cílem praktické části je porovnat protilátky proti endoglinu od různých výrobců a zvířecích modelů a vybrat vhodné pro identifikaci endoglinu na WB ve vzorcích jater, aorty a buněčných kontrol pro výzkum této skupiny závažných onemocnění.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 *Kardiovaskulární onemocnění*

Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově jednou z hlavních příčin předčasných úmrtí. Téměř všechna kardiovaskulární onemocnění, jejich patogeneze a progrese, jsou převážně aterosklerotického původu, který vede k rozvoji onemocnění koronárních tepen, cerebrovaskulárních onemocnění a onemocnění periferních cév končící infarktem myokardu, arytmií nebo cévní mozkovou příhodou. Rizikové faktory podporující rozvoj kardiovaskulárních onemocnění jsou v dnešní době dobře známy a řadíme mezi ně hypertenzi, hyperlipidémii, diabetes, obezitu a špatný životní styl zahrnující nedostatek fyzické aktivity, kouření, nadměrný příjem potravy bohaté na tuky. Tyto faktory se společně podílejí na vzniku kardiovaskulárních onemocnění z více než 90 % ⁽¹²⁾.

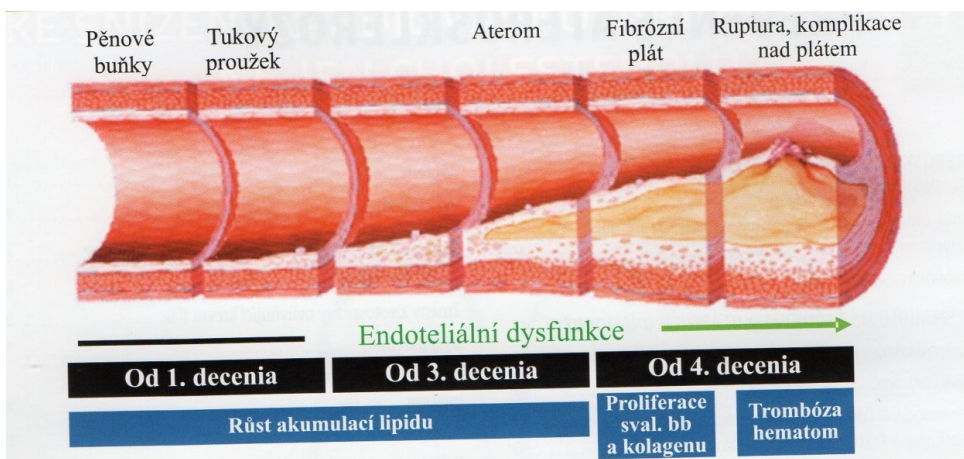
1.1.1 Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza

Zdravý cévní endotel je udržován v klidovém stavu především vlivem vazodilatačních mediátorů jako jsou oxid dusnatý a prostacykliny. Při aktivaci endotelu, vlivem obranné reakce nebo přítomnosti kardiovaskulárních rizikových faktorů jako hyperlipidémie, hypertenze, hyperglykémie, dochází k přepnutí signalizace a uplatňuje se vazokonstrikce zprostředkovaná uvolněním endothelinu I, angiotenzinu II a trombinu. Chronická aktivace endotelových buněk vede k endoteliální dysfunkci, která předchází rozvoji aterosklerózy. Ta může mít za následek onemocnění koronárních či periferních tepen, akutní infarkt myokardu nebo cévní mozkovou příhodu – mrtvici ⁽⁵⁾.

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění postihující velké a středně velké tepny ^(13; 14), nejčastěji se jedná o aortu a to především o její břišní část ⁽¹⁵⁾. Nemoc se zakládá již v dětství a progreduje dále v dospělosti ^(16; 17), bývá podkladem většiny kardiovaskulárních onemocnění ^(5; 18). Komplikace doprovází pacienta v průběhu dospělosti i stáří ⁽¹⁷⁾. Onemocnění je charakterizováno ukládáním tuků do vnitřní vrstvy stěny tepny, tzv. intimy ^(15; 18), čímž se zužuje průsvit cévy a zhoršuje

průtok krve, tkáň za takto postiženým místem je nedostatečně zásobena živinami a kyslíkem, což může končit akutní ischemickou příhodou. Patogenezi aterosklerózy můžeme rozdělit do tří fází: iniciace, progresse a komplikace ⁽¹⁸⁾. Ateroskleróza začíná poškozením endotelu ⁽¹³⁾, následně se začne ukládat LDL (lipoprotein o nízké hustotě) cholesterol do cévní stěny. LDL cholesterol je sférický lipoprotein transportující molekuly cholesterolu v krvi, tomu odpovídá i jeho složení, kdy střed LDL částice je tvořen převážně cholesterolem a triacylglyceroly obalenými hydrofilní vrstvou fosfolipidů proloženou bílkovinnou molekulou - apolipoproteinem B ^(13; 18). Tukové částice se do cévní stěny začínají ukládat již po narození ⁽¹⁷⁾ a označují se jako časné léze v tzv. predilekčních místech pro další závažnější léze ⁽¹⁶⁾. Následně do cévní stěny vstupují monocyty produkující řadu prozánětlivých molekul (prozánětlivé cytokiny, reaktivní formy kyslíku) a vykazují zvýšenou produkci enzymů – matricových metaloproteáz. Tyto cirkulující monocyty se vážou na adhezivní molekuly exprimované aktivovaným endotelem. Monocyty se po přestupu z krevního řečiště do intimy cév stávají makrofágy, které exprimují tzv. scavengerové receptory, přes které se vážou na lipoproteinové částice, jež pohltní ^(13; 18; 19). Za fyziologického stavu mohou makrofágy opět vycestovat zpět do krevního řečiště. Avšak v patologickém stavu, kdy je jejich rozměr příliš velký kvůli pohlceným tukům, zůstávají v intimě cévy a stávají se z nich tzv. pěnové buňky ^(13; 16; 18; 19). V další fázi přecházejí do intimy i hladkosvalové buňky ze střední vrstvy cévní stěny, změní svůj fenotyp a začnou produkovat mezibuněčnou hmotu obsahující kolagen, elastin, proteoglykany, glykosaminoglykany, to má za následek ztlustění intimy. Vznikají aterosklerotické pláty, v další progresi onemocnění pokračuje akumulace tuků v cévní stěně. S postupem léze buňky v plátu podléhají apoptóze a tvoří nekrotické jádro ateromu bohaté na lipidy jevící se jako kašovitá hmota (kaše = athera řec.) ^(13; 15; 18; 19). V typickém ateromovém jádru se nachází drť z krystalů volného cholesterolu, lymfocyty, makrofágy a buňky hladké cévní svaloviny ⁽¹⁶⁾. Povrch endotelu nad ateromovým plátem je značně poničen a usnadňuje tak vznik nástěnné trombózy ⁽¹⁵⁾. V pozdějších fázích kornatění tepen může dojít k prasknutí aterosklerotického plátu, což může být usnadněno působením matricových metaloproteáz produkovaných pěnovými buňkami ⁽¹⁹⁾. Na prasklém plátu vznikne destičková zátka – trombus (Obr. 1), která zabraňuje průtoku krve k místu za trombem ^(13; 16). Ne všechny tromby uzavírají cévu, některé podléhají lýze v důsledku

fibrinolytické ochrany, takto se rozkládající trombus stává zdrojem transformujícího růstového faktoru β . K rozvoji onemocnění značně přispívá nezdravý životní styl, vysoký krevní tlak, stres, cukrovka, centrální obezita, inzulínová rezistence zvýšená hladina cholesterolu a triacylglycerolů v krvi ^(13; 16; 18). Tyto stavy můžeme označit jako ovlivnitelné rizikové faktory, mezi neovlivnitelné patří například věk či pohlaví (častější výskyt u mužů) ⁽¹⁶⁾. Příznaky se odvíjejí od místa, kde došlo k poškození cévy, v případě zasažení koronárních tepen vzniká angina pectoris či infarkt myokardu projevující se bolestí na hrudi, při uzávěru tepen mozku vzniká cévní mozková příhoda a při postižení cév na nohou vzniká ischemická choroba dolních končetin projevující se bolestí při chůzi a později i klidovou bolestí ^(18; 19).



Obrázek č. 1 Rozvoj aterosklerózy (převzato z Vojáček et al, 2017 ¹⁷)

1.1.2 Hereditární hemoragická teleangiektázie

Jedná se o dědičné autozomálně dominantní onemocnění cév ⁽²⁰⁾ známé také jako Rendu-Osler-Weberův syndrom ^(4; 7; 10; 21; 22), s incidencí okolo 1:5000-8000 obyvatel ^(20; 21). Teleangiektázie je obecně onemocnění charakterizované výskytem drobných cév a vlásečnic nacházejících se těsně pod sliznicí či kůží, kde vytvářejí tenké pavučinovitě „čárky“ – metličky (Obr. 2 A), které mohou být v odstínech modré, červené či fialové barvy a po stisknutí bělat. Tyto drobné cévky jsou náchylnější k prasknutí projevující se jako drobné krvácení. Metličky se nejčastěji objevují na pokožce obličeje, dále pak na krku, bradě, hrudníku a končetinách. Ve většině případů nejsou teleangiektázie nebezpečné, výjimkou je hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT) (Obr. 2 B), při kterém vznikají v kůži abnormální krevní cévy ⁽²³⁾. Tato vzácná nemoc je charakterizována různými vaskulárními defekty zahrnující

epistaxi, dilataci cév a aterovenózní malformace ^(20; 21). Pacienti s HHT trpí častým krvácením z nosu (až 95 % pacientů) a to už od 12 let a arteriovenózními malformacemi v játrech, plicích a mozku, ale i přes tyto komplikace má většina pacientů normální délku života ^(7; 21; 22). Pulmonální aterovenózní malformace se vyskytují u 15-45 % pacientů a jsou často nediagnostikované a asymptomatické, naopak aterovenózní malformace jater se vyskytují u více jak 70 % pacientů, ale symptomy jaterního onemocnění se projeví pouze u 8 % nemocných ^(21; 22).

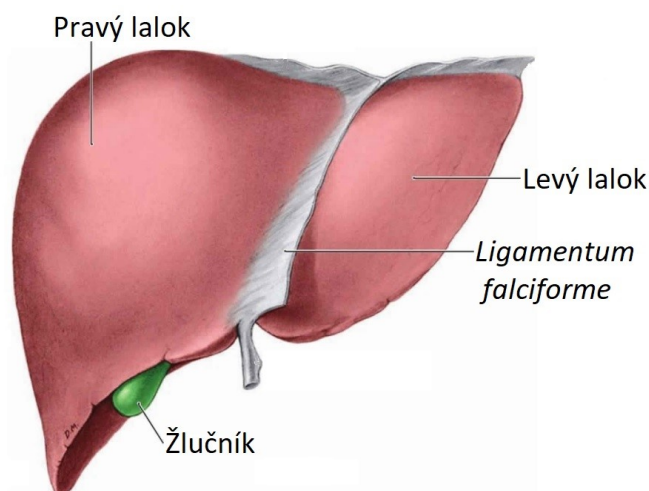


Obrázek č. 2 A Pavučinové metličky; B HHT rtů a brady (převzato z Oakley, DermNetNZ, 2014 ²⁴)

1.1.3 Fibróza srdečního myokardu

Fibróza myokardu může zapříčinit ztrátu normální srdeční funkce a vést tak k selhání srdce. Patří mezi častá onemocnění starších pacientů a nejčastější příčiny úmrtí po celém světě. Rizikovými faktory rozvoje srdeční fibrózy a následně srdečního selhání jsou koronární choroba srdeční a hypertenze. Fibróza myokardu může vzniknout jako důsledek infarktu myokardu. Infarkt myokardu vzniká při okluzi koronární tepny, srdeční myocyty jsou v dané části srdce nedostatečně zásobeny a odumírají, to vede k remodelaci srdce. Tato remodelace může zapříčinit fibrózu srdce, snížit kontraktilitu levé srdeční komory a skončit srdečním selháním ⁽⁸⁾.

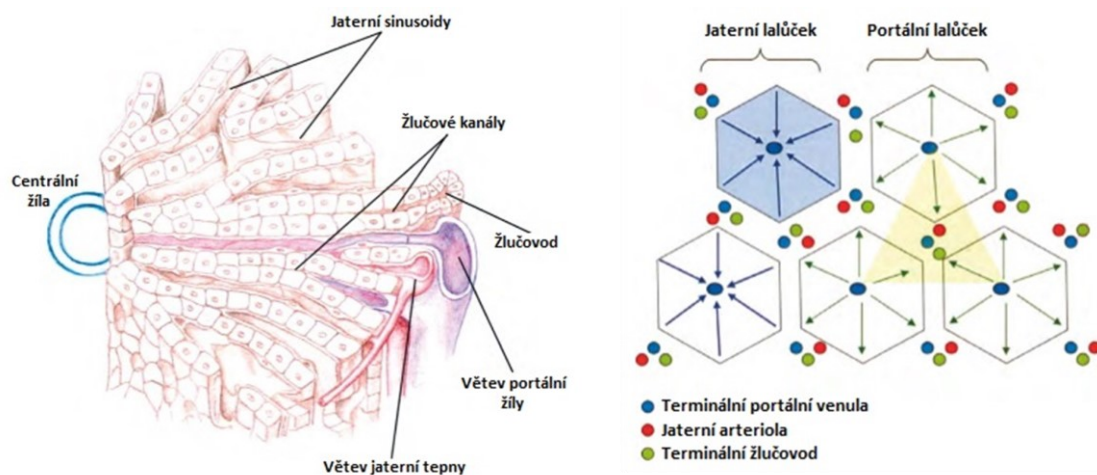
1.2 Játra



Obrázek č. 3 Tvar a anatomie jater (převzato z HealthJade, 2022 ²⁵)

Jsou jedním z největších orgánů a nejtěžší žlázou, tvoří zhruba 3 % hmotnosti dospělého člověka, jejich váha se pohybuje v rozmezí 1 200 – 1 800 g v závislosti na pohlaví a tělesné konstituci ^(26; 27; 28). Tento orgán je tvořen parenchymovou tkání a je uložen intraperitoneálně ⁽²⁶⁾, vpravo pod bránicí ^(26; 28) – svou polohu mírně mění kvůli dýchacím pohybům bránice ⁽²⁶⁾. Jedná se o křehký orgán hnědočervené barvy ⁽²⁸⁾.

Tvarem (Obr. 3) játra připomínají trojboký jehlan se základnou k pravé břišní stěně a vrcholem k levé břišní stěně. Horní plocha jater se dotýká bránice, dolní plocha je obrácena k orgánům dutiny břišní. Zepředu jsou kryta peritoneem a jejich zadní část přirůstá k bránici ⁽²⁸⁾. Pomocí vazy *ligamentum falciforme* jsou z přední strany asymetricky rozdělena na pravý a levý lalok ^(25; 26). Místem vstupu a výstupu cév, nervů a žlučovodu do jater je *porta hepatis*. Játra jsou prokrvena venózní i arteriální krví ⁽⁴⁾ a jejich krevní oběh můžeme rozdělit na funkční a nutritivní ⁽²⁸⁾. Funkční oběh jater zajišťuje zaprvé portální žíla (*vena portae*), která shromažďuje žilní krev bohatou na živiny přicházející z nepárových břišních orgánů. Zásobní neboli nutritivní funkci má *arteria hepatica propria*, která do jater přivádí tepennou krev bohatou na kyslík. Žilní systém jater ústí do dolní duté žíly (*vena cava inferior*) ^(26; 28). Žluč vznikající v játrech je odváděna z jaterních lalůčků (Obr. 4) nejprve kapilárními prostory bez vlastní výstelky, typický biliární epitel se začíná objevovat až na periferiích lalůčků, směrem k portobiliárnímu prostoru ⁽²⁶⁾. Žlučové cesty nakonec ústí do žlučníku, kde se žluč hromadí a zahušťuje ^(26; 28).



Obrázek č. 4 Schéma jaterního lalůčku (převzato z Hůlek a kol, 2018 ²⁶)

Jaterní buňky jsou označovány jako hepatocyty ^(27; 28), ty jsou seřazeny do řad a následně tak tvoří trámce, mezi těmito trámci probíhají krevní cévy a žlučové kapiláry ⁽²⁸⁾. Hepatocyty plní v organismu nejrůznější funkce, kromě tvorby žluči zajišťují metabolismus cukrů, tuků, bílkovin a detoxikaci organismu. Za pomoci dalších jaterních buněk se v játrech skladují vitamíny rozpustné v tucích, železo a podílejí se na odstraňování starých červených krvinek činností Kupfferových buněk ⁽²⁷⁾.

Důležitost jater spočívá v jejich hlavní roli v intermediárním a energetickém metabolismu, vykonávají ale i řadu dalších funkcí, jako je například tvorba a vylučování žluči, biotransformace xenobiotik, tvorba, skladování a přeměna různých signálních molekul (např. angiotenzinogen, erythropoetin, trombopoetin, hepcidin) a také imunitní funkce zprostředkovaná tkáňovými makrofágy - Kupfferovými buňkami. Většinu těchto funkcí zajišťují hepatocyty – parenchymové buňky jater. Buněčnou populaci jaterní tkáně ale také představují neparenchymové buňky jako již zmíněné Kupfferovy buňky, dále epitelové buňky žlučových cest, tzv. cholangiocyty, hvězdicové Itovy buňky, endotelové buňky tvořící bariéru mezi krví a hepatocyty a Pit buňky – vysoce pohyblivé lymfocyty ze skupiny NK buněk (přirození zabíječi) uplatňující se při virových infekcích a likvidaci nádorových buněk. Zvláštní pozornost si zaslouží hvězdicové buňky, které obsahují kontraktilní proteiny aktin a myozin a produkují bílkoviny extracelulární matrix. Při poškození hepatocytů ztrácejí tyto buňky tukové kapénky, následně proliferují a migrují do perivenózního prostoru, změní se na buňky podobné myofibroblastům a začnou produkovat kolagen I, III, IV typu a laminin, čímž přispívají k rozvoji fibrózy a cirhózy jater ⁽²⁶⁾.

1.2.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je stav zahrnující spoustu symptomů a stavů, které se často vyskytují současně, jako například inzulinová rezistence (nebezpečný prozánětlivý stav vedoucí k peroxidaci tuků a vzniku volných radikálů), arteriální hypertenze, endoteliální dysfunkce, hyperglykémie, hypercholesterolémie a jiné, které představují rizikové faktory pro rozvoj kardiometabolických poruch, jako je například ateroskleróza, nealkoholová tuková nemoc jater a jiné ⁽⁹⁾. Bývá také označován jako syndrom X, Reavenův syndrom, syndrom inzulinové rezistence nebo „smrtné kvarteto“ – souhrnný název zahrnující abdominální obezitu, inzulinovou rezistenci (nebo diabetes 2. typu), systémovou hypertenzi a dyslipidémii. Jedná se o prozánětlivý a protrombotický stav doprovázený zvýšenou aktivitou zánětlivých cytokinů. Výskyt metabolického syndromu se celosvětově odhaduje až na 50 % populace nad 60 let. Rizikové faktory metabolického syndromu se značně odvíjejí od životního stylu. Riziko tak zvyšuje kouření, fyzická nečinnost, konzumace slazených nápojů či nadměrná konzumace alkoholu. Svůj vliv mají i faktory, které ovlivnit nelze, jako je například pozitivní rodinná anamnéza, rostoucí věk nebo postmenopauzální stav ⁽²⁹⁾.

Metabolický syndrom je charakterizován přítomností minimálně tří z následně uvedených parametrů zároveň spojených s inzulinovou rezistencí: hypertenze (nad 130/85 mmHg/léčená hypertenze), obvod pasu větší jak 94 cm u mužů a jak 80 cm u žen (viscerální ukládání tuků, obezita), sérové triacylglyceroly nad 1,7 mmol/l, HDL-cholesterol nižší jak 1,0 mmol/l u mužů a jak 1,3 mmol/l u žen a glykémie nalačno víc jak 5,6 mmol/l či léčený diabetes mellitus 2. typu ^(26; 30; 31; 32). Na vzniku inzulinové rezistence se z velké části podílí patologicky zmnožená tuková tkáň, ve které vzniká velké množství prozánětlivě aktivních adipokinů neboli adipocytokinů, což jsou hormony tukové tkáně (adipocytů) ^(26; 33). V důsledku přebytké výživy podléhají adipocyty hypertrofii a hyperplazii, krevní zásobení není tak schopné pokrýt nároky tukové tkáně což vede k hypoxickému stavu. Buňky kvůli hypoxii podléhají nekróze s infiltrací makrofágů a tvorbou adipokinů, mezi které patří prozánětlivý interleukin-6, tumor nekrotizující faktor α a protrombotický inhibitor aktivátoru plazminogenu I ⁽²⁹⁾. Následně může docházet k rozvoji endoteliální dysfunkce, přítomnost adipokinů navíc zvyšuje trombogenicitu krve ⁽³⁴⁾. Nadměrné ukládání tuků do jiné než tukové tkáně,

jako jsou např. játra, srdce, ledviny, vede k lipotoxicitě, která je charakterizována aktivací metabolických, oxidačních a zánětlivých drah, mohou vyústit v buněčnou smrt způsobenou mastnými kyselinami a jejich meziprodukty a narušit tak správnou funkci postižených orgánů^(33; 35). Většina cirkulujících volných mastných kyselin je přestavena kyselinou palmitovou, olejovou a linolovou. Kyselina palmitová je schopná aktivovat zánětlivou reakci v endoteliálních buňkách, navíc má toxické účinky na endoplazmatické retikulum, čímž může stimulovat tvorbu reaktivních forem kyslíku, to vede ke stresu endoplazmatického retikula. V případě, že se buňka s tímto stresem nedokáže vyrovnat, spouští dráhu apoptózy⁽³³⁾.

Významným prozánětlivým mediátorem souvisejícím s inzulinovou rezistencí je již zmíněný tumor nekrotizující faktor α , který je produkován aktivovanými makrofágy, ale i tukovou tkání a má klíčovou roli v poškození jater, nekróze hepatocytů a dalším zhoršování inzulinové rezistence. Dalším důležitým mediátorem souvisejícím s jaterní fibrózou je angiotenzin II zvyšující proliferaci a migraci hvězdicových Itoových buněk a jejich následnou produkci kolagenu⁽²⁶⁾.

1.2.2 Nealkoholové ztučnění jater a nealkoholová steatohepatitida

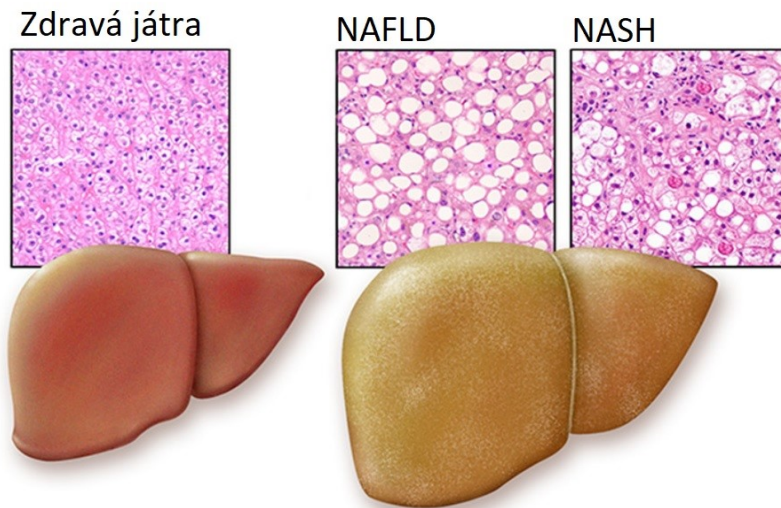
Nealkoholová tuková onemocnění jater (NAFLD) jsou metabolická jaterní onemocnění charakterizovaná nadměrným ukládáním tuku (triacylglycerolů) v játrech u pacientů bez významné konzumace alkoholu^(2; 9; 26; 32; 36; 37; 38). Bývají spojená s inzulinovou rezistencí a jsou definována přítomností tuku v jaterních buňkách s viditelnými intracelulárně uloženými triacylglyceroly. Na základě histologického vyšetření nebo protonovou magnetickou rezonanční spektroskopií se zjišťuje procentuální obsah tuku, přičemž jako hraniční hodnota je považována 5 % tuku z celého objemu jater^(26; 30; 32; 39). NAFLD zahrnuje patologické stavy jako je nealkoholové ztučnění jater (NAFL), zánětlivá progresivní forma označovaná jako nealkoholová steatohepatitida (Obr. 5), jaterní fibrózu, cirhózu a hepatocelulární karcinom.^(26; 32; 33; 38; 39) V současné době onemocnění postihuje 25–30 % populace vyspělých zemí, což souvisí se změnou životního stylu a nárůstem obezity v populaci^(30; 32; 36; 38; 39; 40). NAFL může být označované také jako jednoduché ztučnění jater, neboli steatóza, charakterizované přítomností 5 % a více tuku v játrech s malým nebo žádným

zánětem či poškozením jaterních buněk ⁽³⁷⁾. Často se jedná o jaterní projev metabolického syndromu charakterizovaný profibrotickými změnami v játrech ^(2; 9; 26; 30; 32; 33; 38). Játra se steatózou jsou náchylnější k oxidačnímu poškození, často přítomná inzulinová rezistence zvyšuje oxidační stres v hepatocytech a to buď snížením úrovně β -oxidace nebo stimulací mikrozomálních peroxidáz. Steatóza je považována za benigní onemocnění, tedy tento stav je vratný a jaterní tkáň se může zregenerovat ^(26; 27). Rizikovými faktory rozvoje NAFL jsou především nízká fyzická aktivita a vysoký kalorický příjem převyšující energetický výdej, který organismus řeší ukládáním energeticky bohatých triacylglycerolů do jater a tukové tkáně. Neovlivitelným faktorem je genetická predispozice, např. genetický polymorfismus v genech kódujících důležité proteiny uplatňující se v lipidovém metabolismu ^(26; 33; 38). Mezi další obecně známé rizikové faktory rozvoje NAFL patří abdominální obezita, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, přítomnost metabolického syndromu a inzulinové rezistence ^(32; 40).

NAFL se může vyvinout v závažnější formu jaterního onemocnění označovanou jako nealkoholová steatohepatitida (NASH). NASH je pojem označující poškození jater v širším rozsahu, který je spojen se vznikem zánětu v játrech a jejich fibrotizací. Bývá označován jako steatohepatitida, která s postupem fibrotizace jater může přejít v cirhózu a později i v HCC. NASH lze rozdělit dle pokročilosti fibrózy do několika stádií označovaných jako F0-4: Stádium F0 a F1 zahrnuje jen mírnou fibrózu, F2 je NASH s významnou fibrózou, F3 je NASH s pokročilou fibrózou a F4 NASH s plně rozvinutou cirhózou ^(26; 30; 33; 37). Zatímco stádia F0-3 jsou stále reverzibilní, stádium F4 je již ireverzibilní. Dochází totiž k nezvratným změnám struktury a funkce jater způsobených mohutnou fibrotizací tkáně, která je příčinou jejich destrukce bez možnosti regenerace a hrozí selhání jater ^(9; 26). NASH také představuje vysoké riziko rozvoje hepatocelulárního karcinomu až u 20 % pacientů ⁽³²⁾. I toto onemocnění bývá často spojováno s cukrovkou 2. typu a inzulinovou rezistencí, která podporuje jaterní *de novo* lipogenezi a lipolýzu v tukové tkáni, tím se zvyšuje tok mastných kyselin do jater ⁽³⁰⁾.

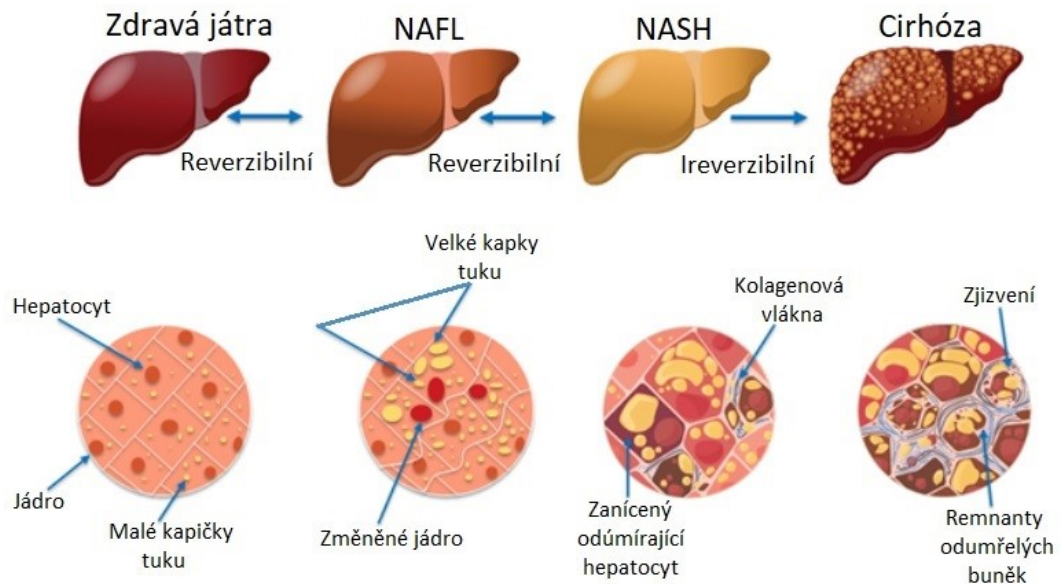
NASH se může projevovat i extrahepatálními projevy, jako je hypertenze, dyslipidémie, spánková apnoe a odlišný mikrobiom oproti zdravým lidem, který je přerůstající a produkující hepatotoxický ethanol ^(30; 32; 33; 38; 40). Odbourávání endogenního ethanolu podporuje vznik a rozvoj steatózy a oxidačního stresu v játrech.

Dysbióza je u pacientů zodpovědná za zvýšenou střevní permeabilitu, vyšší absorpci monosacharidů a také za vyšší produkci hepatotoxických produktů. To může mít u některých vnímavých jedinců za následek aktivaci zánětlivých mediátorů a podpořit tak rozvoj fibrózy a následné cirhózy ^(32; 40).



Obrázek č. 5 Porovnání vzhledu a histologického preparátu zdravých jater s NAFL a NASH (převzato z HealthJade, 2022 ³⁷⁾)

Rozvoj NAFL v NASH a cirhózu je znázorněn na obrázku spolu s vratností jednotlivých patologií (Obr. 6). Na obrázku je vidět, že u NAFL se v hepatocytech hromadí přebytečný tuk (tukové kapénky), to vede ke steatóze jater ⁽⁴¹⁾, která se v důsledku akumulace tuků zvětší. Typickým nálezem, při použití sonografie, je nápadně světlá barva jater zasažených steatózou ⁽³⁸⁾. V dalším stádiu – NASH dochází k dalšímu rozvoji steatózy, hepatocyty s nahromaděným tukem bobtnají (játra se tak zvětšují) a následně umírají, to vede k zánětlivé reakci. Odumřelé buňky jsou nahrazovány kolagenními vlákny jevícími se jako jizvy – fibróza. V rámci let či desetiletí se odumřelé hepatocyty dále odbourávají a hromadí se zjizvená tkáň, která tuhne. Tento stav je známý jako cirhóza a zvyšuje riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu ⁽⁴¹⁾. Cirhotická játra jsou charakterizována uzlovitou přestavbou parenchymu jater. Na takových játrech jsou vidět úseky, kde se střídá nekróza tkáně s regenerací hepatocytů a zvýšenou tvorbou vaziva vedoucí ke zmíněné tuhosti jater. V pokročilém stádiu cirhózy jsou játra malá, tuhá a hrbolatá s přítomností uzlovitých struktur ⁽¹⁵⁾.



Obrázek č. 6 Progrese onemocnění NAFLD (převzato z Drew, 2017⁴¹)

1.2.3 Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je jedním z nejčastějších zhoubných nádorů jater a celosvětově je druhou až třetí nejčastější příčinou úmrtí na zhoubné nádory (3; 26; 38; 42; 43). Incidence tohoto nádoru v České republice je 0,8/100 000 obyvatel (26). Onemocnění se vyskytuje častěji u mužů než u žen s rostoucí incidencí se zvyšujícím se věkem. Nejčastěji se HCC vyskytuje u pacientů okolo 70 let (38; 43; 44). Na vzniku HCC se z podstatné části podílí virová onemocnění jater a to především virus hepatitidy B, o něco méně často virus hepatitidy C (15; 26; 42; 45), které jsou celosvětově zodpovědné za zhruba 80 % hepatocelulárních karcinomů (42). Dalšími rizikovými faktory jsou nadměrná konzumace alkoholu, kouření, metabolický syndrom, abdominální obezita, diabetes a NAFLD (43; 44; 45). Toto riziko se značně zvyšuje ještě více u pacientů s NAFLD a s dalším přidruženým onemocněním, jako je zmíněný diabetes, obezita, dyslipidémie či hypertenze (43). Dále mají vysoké riziko pacienti s jaterní cirhózou, ta přechází do HCC u 95 % pacientů (26; 42), u zbylých 5 % pacientů se HCC vyskytuje nezávisle na přítomnosti onemocnění jater. Ohroženou skupinou jsou i pacienti s NASH, u kterých se dá jen těžko předvídat časový přechod onemocnění do cirhózy, která zvyšuje riziko rozvoje onemocnění do HCC. U pacientů bez předchozího jaterního onemocnění se vyskytuje tzv. fibrolamelární forma, typická spíše pro mladší nemocné

a v případě, že játra nejsou zasažena cirhózou, dá se nádor odstranit chirurgickou resekcí, jedná se tedy o formu s lepší prognózou. U cirhotických jater může každé ložisko představovat hepatocelulární karcinom a prognóza je u symptomatických pacientů špatná, proto je velice důležitá včasná diagnóza ⁽²⁶⁾. Ranná stádia nemoci jsou asymptomatická ^(26; 38; 44), pokročilejší stádia se mohou projevovat jako běžná jaterní onemocnění. Bolesti břicha, nechutenství, úbytek na váze a únava bývají příznaky pozdní ^(26; 38).

Pro hepatocelulární karcinom je typická hypervaskularizace, angiogeneze je pro HCC nezbytná pro jeho rozvoj, metastázování a určení prognózy onemocnění ⁽⁴⁾. Rizikový pacienti, jejichž stav umožňuje případnou léčbu, by měli být zahrnuti do pravidelného sledování – surveillance, která má za cíl brzy odhalit HCC, zahájit potřebnou léčbu a snížit tak riziko úmrtí na toto onemocnění ^(26; 42).

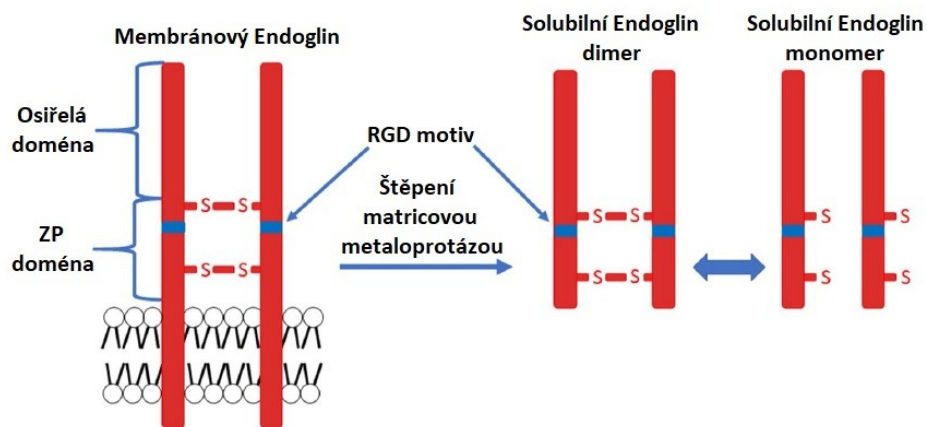
1.3 Endoglin

Endoglin (CD105) je transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa, který funguje jako koreceptor pro ligandy nadrodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) ^(1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9). Gen pro endoglin se u lidí nachází na 9 chromozomu ^(3; 7).

Z hlediska struktury (Obr. 8 A) se jedná o homodimer spojený disulfidovými můstky skládající se z hydrofilní extracelulární části, hydrofobní intramembránové části a krátké cytoplazmatické oblasti, která je bohatá na aminokyseliny serin/threonin, ta je zodpovědná za jeho funkci jako koreceptoru modulujícího odpověď. Endoglin se může vyskytovat jako membránový, který je exprimován na membráně různých buněk nebo jako solubilní endoglin (sEng), který po enzymatickém odštěpení z extracelulární části molekuly, cirkuluje v plazmě ^(3; 4; 5; 7; 9). Enzymy štěpící endoglin jsou tzv. membránově vázané matricové metaloproteázy MMP-1, MMP-12 a MMP-14 ^(1; 2; 4; 7; 9; 10), které jsou vylučovány zánětlivými makrofágy. Enzymy štěpí membránový endoglin v extracelulární části v blízkosti cytoplazmatické membrány. Vzniká tak tzv. rozpustná forma endoglinu neboli solubilní endoglin ^(4; 7; 8). To může narušit vaskulární remodelaci a vést až ke vzniku vaskulárních abnormalit ⁽⁷⁾. Tato forma endoglinu se nachází v krevním oběhu zdravých lidí, ale i u pacientů trpících jaterním nebo

kardiovaskulárním onemocněním, sEng se uvolňuje do krve nejen ze zdravých buněk (endoteliální buňky), ale i z buněk rakovinných, které na svém povrchu exprimují endoglin⁽⁴⁾.

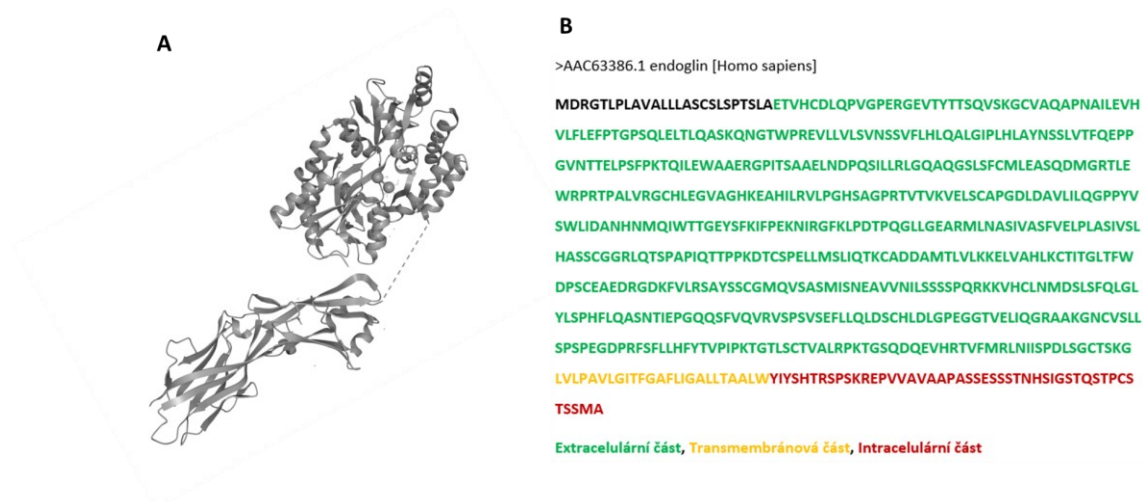
Podle Vicena a kol. obsahuje extracelulární část osiřelou doménu a doménu zóna pellucida (ZP), které odpovídají za interakce s TGF- β a RGD receptory. Část této ZP domény, která je tvořena arginyl-glycyl-asparagovou kyselinou (RGD), slouží jako rozpoznávací struktura pro vazbu integrinů a dalších RGD receptorů (např. na monocytech)⁽⁹⁾. Takto popsaná struktura je znázorněna na obrázku (Obr. 7).



Obrázek č. 7 Struktura endoglinu podle Vicena a kol. (převzato z Vicen et al, 2020⁹⁾)

1.3.1 Nukleotidová sekvence dlouhé izofomy

V lidské a myší tkáni se nachází dvě izofomy, a to krátký a dlouhý endoglin, který je exprimován převážně. Obě izofomy endoglin se od sebe liší délkou cytoplazmatické domény – krátký 14 a dlouhý 47 aminokyselin^(3; 4; 5; 7; 9; 10). Nukleotidová sekvence dlouhé izofomy endoglinu je znázorněna na obrázku (Obr. 8 B).



Obrázek č. 8 A 3D struktura transmembránového endoglinu (převzato z UniProt, 2022 ¹¹);
B Nukleotidová sekvence dlouhé izoformy (převzato z NCBI, 2022 ⁴⁶)

1.3.2 Výskyt Endoglinu a jeho role ve fyziologickém stavu

Endoglin je exprimován na membráně různých buněk, mezi které patří endotelové buňky hladké vaskulární svaloviny, jaterní buňky, fibroblasty, aktivované monocyty a makrofágy ^(1; 2; 5; 9; 10). V těchto zdravých buňkách se vyskytuje především dlouhá izoforma endoglinu, krátká izoforma se hojně vyskytuje ve stárnoucích endotelových buňkách ^(3; 4).

Funguje jako cévní endotelový glykoprotein hrající důležitou roli při regulaci angiogeneze ^(8; 9) - reguluje proliferaci a migraci endotelových buněk ⁽⁷⁾. Podílí se na normální struktuře cév a jejich integritě a je také důležitý pro správnou extraembryonální angiogenezi a normální embryonální vývoj srdce ⁽¹¹⁾. Studie na myších ukázala, že úplná ztráta endoglinu je embryonálně letální, a to kvůli zhoršenému vývoji vaskulárního plexu do zralé cévní sítě, to vede k osmotické nerovnováze, která narušuje přirozený vývoj srdce ⁽⁷⁾. Je tedy důležitý pro fyziologickou funkci endotelu ⁽⁹⁾.

Endoglin hraje roli i v hemostáze a může se podílet na vzniku zánětlivých nebo trombotických změn v cévách, neboť extracelulární část lidského endoglinu podporuje adhezi krevních destiček k endotelu cév pomocí destičkového integrinu $\alpha_{IIb}\beta_3$ ⁽⁴⁾.

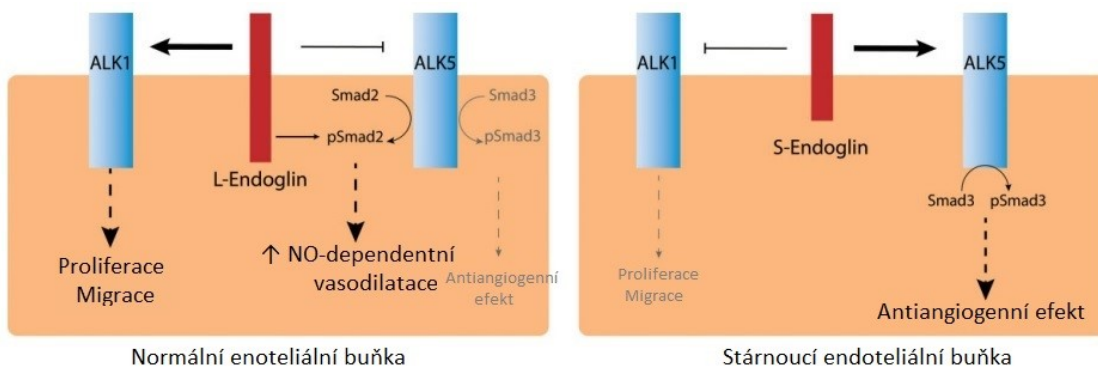
Na regulaci exprese endoteliálního endoglinu se podílí TGF- β , kosterní morfogenetický protein (BMP)-9 a hypoxie ^(4; 7). Endoglin produkovaný jaterními

hvězdicovými buňkami má pravděpodobně protektivní roli proti fibrotickému poškození a to zřejmě modulací signalizace TGF- β . Studie na myších prokázala, že nedostatek endoglinu u jaterních hvězdicových buněk značně zhoršuje fibrózu po poranění u myší s jaterní fibrózou ⁽⁴⁾.

1.3.3 Signalizace endoglinem a jeho ligandy

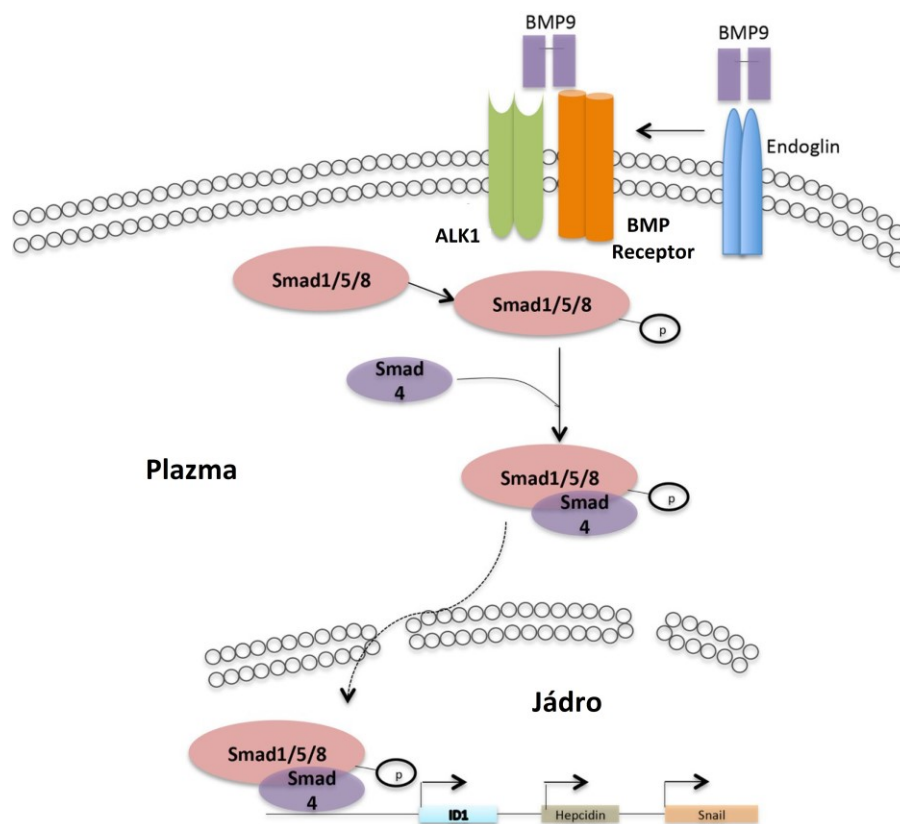
Protože endoglin funguje jako koreceptor, k indukci signalizace vyžaduje spolupráci s dalšími receptory, jedná se o transmembránové receptory anaplastické lymfomové kinázy (ALK). Ligandy vázající se na tyto receptory jsou TGF- β a BMP-9 ⁽⁷⁾.

Po navázání ligandu vzniká heterotetramerní receptorový komplex, to vede k transfosforylaci transmembránového ALK receptoru na serinových/threoninových zbytcích v intracelulární oblasti. Dlouhý endoglin zajišťuje signalizaci prostřednictvím dráhy ALK-1 a krátký endoglin přes ALK-5 (Obr. 9). Aktivace těchto drah vede k fosforylaci SMAD 1/5/8 (ALK-1 dráha) nebo SMAD 2/3 (ALK-5 dráha), které se následně translokují do jádra, kde spustí transkripci různých genů ^(3; 4; 5; 7; 9; 20). SMAD jsou třídou proteinů fungujících jako intracelulární signalizační efektory pro nadrodinu TGF- β polypeptidů ⁽⁴⁷⁾. Faktory TGF- β regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Dlouhý endoglin stimuluje endotel k migraci buněk, proliferaci a angiogenezi, zatímco u krátkého endoglinu se zdá, že inhibuje endotel k buněčné migraci a proliferaci a zřejmě indukuje stárnutí endoteliálních buněk, nicméně přesná funkce Krátkého endoglinu není zatím důkladně prostudována ^(4; 5; 9). Jak již bylo řečeno, dlouhý endoglin podporuje aktivaci dráhy ALK-1 a zároveň inhibuje aktivaci dráhy ALK-5 ^(3; 5; 10). Studie na hlodavcích prokázaly, že krátký endoglin působí jako anti-angiogenní činidlo proti dlouhému endoglinu ^(3; 4).



Obrázek č. 9 Signalizační dráha dlouhým endoglinem (L-endoglin) a krátkým endoglinem (S-Endoglin) (převzato z Leite et al, 2020⁵)

BMP se váže přímo prostřednictvím komplexu ALK-1 (Obr. 10), tento komplex dokáže vázat BMP-9 či BMP-10 s mnohem větší afinitou než TGF- β (7; 20). V tomto případě se zdá, že endoglin spíše zesiluje signalizaci ALK-1 po vazbě BMP-9, BMP-10 (20). Některé studie zaznamenali inhibiční účinek BMP-9 na angiogenezi (7).



Obrázek č. 10 Signalizace BMP ligandem (převzato z Bi et al, 2014⁴⁸)

Endoglin má vliv na endotel i nezávisle na drahách TGF- β – moduluje reorganizaci cytoskeletu, inhibuje apoptózu a ovlivňuje expresi endoteliální syntázy oxidu dusného (3; 4).

1.3.4 Endoglin a kardiovaskulární onemocnění

Mezi kardiovaskulární onemocnění, u kterých se zkoumá vliv endoglinu na jejich rozvoj patří například ateroskleróza, kterou předchází hypercholesterolémie a následná endoteliální dysfunkce, vratný předstupeň aterosklerózy. Další onemocnění, u kterých byly zaznamenány změny buď v expresi endoglinu na buněčných membránách, v hladině sEng v plazmě či v mutaci genu pro endoglin jsou například HHT, myokardiální fibróza a srdeční selhání.

1.3.4.1 Endoteliální dysfunkce a ateroskleróza v souvislosti s Endoglinem

V aterogenezi se uplatňují účinky TGF- β , které jsou komplexní. TGF- β podporuje stabilní fenotyp aterosklerotických lézí tím, že stimuluje syntézu a ukládání extracelulární matrix, potlačuje zánětlivé pochody a produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Exprese obou forem endoglinu je nejprve v aterosklerotických plátech zvýšena, v průběhu onemocnění se ale mění. Proaterogenní mediátory se můžou podílet na uvolnění sEng, který působí jako „lapač“ TGF- β ligandu. Tato molekula je podobná krátkému endoglinu a podporuje aterogenezi tím, že inhibuje expresi endoteliální syntázy oxidu dusnatého eNOS a signalizaci pomocí TGF- β , který se vyvazuje do komplexu se sEng. U pacientů s aterosklerózou byla zjištěna snížená hladina aktivního TGF- β v důsledku tvorby komplexů s uvolněným sEng, čímž je znemožněna jeho vazba na transmembránový endoglin. Podle studie od Stefoni a kol. byla u pacientů s renálním onemocněním v konečném stádiu nízká hladina TGF- β v séru rizikovým faktorem pro aterosklerózu. Solubilní endoglin přispívá k zánětlivým procesům v endoteliálních buňkách a zhoršuje vazodilataci zprostředkovanou oxidem dusným, především v přítomnosti dalších kardiovaskulárních rizikových faktorů, jako je například hypercholesterolémie ⁽⁵⁾.

Hypercholesterolémie vyústila v rámci dvou měsíců u myší ve vývoj endoteliální dysfunkce v aortě se sníženou expresí endoglinu a eNOS, která je nezbytná pro udržení správné funkce cévního endotelu. Endoteliální dysfunkce je prvním projevem aterosklerózy. Sníženou expresí endoglinu a eNOS se snížila produkce oxidu dusnatého a zvýšila hladina solubilního endoglinu v plazmě, zároveň došlo k indukci zánětu. Tento poznatek naznačuje, že důležitou roli v prevenci endoteliální dysfunkce hraje správná

exprese endoglinu, snížená exprese endoglinu je spojená se sníženou tvorbou oxidu dusnatého a endoteliální dysfunkcí, a to ještě před vznikem aterosklerotických lézí. Rozvoj aterogeneze a následné zvětšování aterosklerotických lézí je spojeno se sníženou expresí endoglinu v aortě a zvýšenou koncentrací sEng v plazmě. Tyto poznatky by se mohly interpretovat způsobem, že snížená exprese endoglinu a zvýšená hladina solubilního endoglinu v plazmě je znakem rozvoje endoteliální dysfunkce a následné aterogeneze ⁽⁹⁾.

Arteriální hypertenze, hypercholesterolémie, diabetes mellitus a zánět jsou stavy, u kterých byly zaznamenány zvýšené hladiny sEng v plazmě, nicméně je důležité zmínit, že výsledky z různých studií se v tomto ohledu neshodují, čímž se snižuje reprodukovatelnost výsledku sEng jako biomarkeru endoteliální dysfunkce. V důsledku toho proběhly další studie s cílem vysvětlit tuto heterogenitu výsledků a nejpříjemnějším závěrem je, že sEng je časným indikátorem vaskulárních změn a s dalším rozvojem onemocnění jeho hladina klesá. To může být způsobeno již zmíněnou zvýšenou tvorbou komplexů sEng/TGF- β , což zhoršuje funkci TGF- β a přispívá k aterogenezi. Tato teorie byla podpořena studií od Li a kol., kde měřili hladinu sEng u pacientů s onemocněním koronárních tepen (CAD). Hladina sEng byla vyšší u pacientů s bolestí na hrudi, která připomínala anginu pectoris, pozitivním zátěžovým elektrokardiogramem, ale normálním angiogramem koronárních tepen. Naopak u pacientů s významným CAD (dokumentovaným v angiografii) byly hladiny sEng nižší ⁽⁵⁾.

Závěrem můžeme říct, že sEng může být užitečným biomarkerem endoteliálního poranění, aktivace, zánětu či stárnutí, ale k celkovému objasnění role sEng v endoteliální dysfunkci a u kardiovaskulárních chorob bude potřeba provést více studií ⁽⁵⁾.

1.3.4.2 Hereditární hemoragická teleangiektázie a endoglin

Jedná se o vzácné dědičné onemocnění, při kterém dochází k mutacím v genech pro endoglin ^(7; 10) – mutace na chromozomu 9q34ter ⁽⁸⁾ (HHT-1) nebo ALK-1 (HHT-2) ^(7; 10; 20), přičemž varianta HHT-1 je závažnější a je charakterizována vaskulárními abnormalitami v mozku a plicích ⁽⁷⁾. Florian a kol. uvádějí, že z 90 % se vyskytuje varianta spojená s heterozygotní mutací genů pro endoglin (HHT-1) či serin/threonin-proteinkinázový receptor R3 (ACVRL-1) (HHT-2). ACVRL-1, jehož exprese je omezena na vaskulární a lymfatický endotel, kóduje receptor pro BMP ligand ALK-1, gen pro endoglin kóduje endoglinový koreceptor. Méně častá varianta vyskytující se u zbývajících 10 % pacientů ovlivňuje gen pro SMAD 4 kódující transkripční faktor SMAD 4, který je součástí transkripčního komplexu aktivovaného ALK cestou. Nejčastější typy mutací postihující geny pro ACVRL-1 a endoglin jsou záměna jednoho páru bazí vedoucí k substituci jiné aminokyseliny ve výsledném proteinu nebo úplná genetická delece. Většina těchto mutovaných proteinů byla exprimována na buněčném povrchu, ale nebyly schopny aktivovat fosforylaci SMAD 1/5/9 a expresi genu reagujícího na BMP. Některé endoglinové mutanty nejsou schopny během své biosyntézy dosáhnout buněčného povrchu a zůstávají tak uvnitř buňky. Pokud jsou uvězněny v endoplasmatickém retikulu, mohou tvořit dimery a reagovat s transmembránovým endoglinem a zhoršit tak jeho expresi na buněčném povrchu. Některé mutanty se exprimují normálně na buněčném povrchu, ale nejsou aktivní ⁽²¹⁾.

1.3.4.3 Fibróza srdečního myokardu a exprese endoglinu

Důležitou roli při vzniku srdeční fibrózy hraje TGF- β , který se může přímo podílet na remodelačním procesu při srdečním selhání. Klíčovým mediátorem vzniku srdeční fibrózy je angiotensin II, který moduluje srdeční remodelaci způsobem, že vyvolá hypertrofii srdečních myocytů a zvýší expresi TGF- β . Angiotensin II spolu s TGF- β zvyšují migraci srdečních fibroblastů, proliferaci a produkci kolagenu, což vede k srdeční fibróze. Zároveň bylo zjištěno, že angiotensin II a TGF- β 1 zvyšují expresi endoglinu v srdečních fibroblastech a také expresi endoglinové mRNA, navíc TGF- β 1 se významně podílí na indukci kolagenu I. Toto zjištění naznačuje, že endoglin funguje jako fibrogenní mediátor TGF- β 1 na srdeční fibroblasty. Při snížení exprese endoglinu

byla syntéza kolagenu I v srdečních fibroblastech menší, což ukazuje na potenciální roli endoglinu v remodelaci srdce ⁽⁸⁾.

1.3.4.4 Endoglin při srdečním selhání

U pacientů s těžkou systolickou dysfunkcí levé komory byla zjištěna zvýšená exprese endoglinu. Zvýšená exprese endoglinu byla také nalezena v levé komoře pacientů s terminálním srdečním selháním. Po chirurgické aplikaci zařízení na podporu levé komory se exprese tohoto proteinu snížila. Endoglin by mohl být potencionálním biomarkem pro akutní selhání srdce a jeho rozpustná forma by mohla být markerem predikce kardiovaskulárních příhod. U pacientů s dysfunkcí levé komory byly naměřeny vyšší hladiny solubilního endoglinu. Zároveň pacienti, u kterých byla koncentrace sEng v krvi vyšší, měli významně vyšší výskyt závažných kardiovaskulárních příhod, jako akutní infarkt myokardu, městnavé selhání srdce nebo cévní mozkovou příhodu než pacienti, u kterých byla koncentrace proteinu nižší ⁽⁸⁾. U pacientů se srdečním selháním se sníženým ejekčním objemem byla zjištěna silná korelace mezi vyšší hladinou sEng a některými prediktory úmrtnosti jako např. vyšší diastolický tlak v levé komoře nebo nižší ejekční frakce levé komory. To naznačuje, že důležitou roli v patofyziologii srdečního selhání může mít jak samotná tkáň, tak solubilní endoglin ⁽⁵⁾.

Vícen a kol. navrhuje, že solubilní endoglin by mohl také sloužit jako biomarker symptomů souvisejících s metabolickým syndromem, jako například hypercholesterolemie, arteriální hypertenze a diabetes mellitus ⁽⁹⁾.

1.3.5 Role Endoglinu u nealkoholové steatohepatitidy

Jaterní hvězdicové buňky jsou hlavním producentem kolagenu a extracelulární matrix, které se při poškození jater ukládají do jaterní tkáně a vyvolávají tak fibrózu ^(2; 10). TGF- β funguje jako profibrogenní cytokin, který moduluje aktivaci klidových jaterních hvězdicových buněk na aktivované myofibroblasty. Klíčové profibrogenní signály jsou v hvězdicových buňkách regulovány především dráhou TGF- β /ALK-5, ale své uplatnění má v této signalizaci i dráha TGF- β /ALK-1. Vzhledem k tomu, že endoglin je koreceptorem pro TGF- β , jeho exprese může hrát důležitou roli v řadě

patologických stavů zahrnujících i fibrózu, která je závažným projevem progredující NASH⁽¹⁰⁾.

Spousta studií *in vitro* naznačuje, že transmembránový endoglin má antifibrotický účinek, ale studie využívající nadměrnou expresi dlouhého endoglinu v jaterních hvězdicových buňkách zaznamenávají spíše profibrogenní roli endoglinu⁽¹⁰⁾. U pacientů s jaterní fibrózou či cirhózou byly detekovány vysoké hladiny solubilního endoglinu^(2; 10). U myši trpících jaterním onemocněním byla zaznamenána zvýšená exprese endoglinu v jaterních hvězdicových buňkách, navíc zvýšená exprese dlouhé formy endoglinu v těchto buňkách myšního a potkaního původu ukazuje, že endoglin stimuluje signalizaci TGF- β ⁽¹⁰⁾. Bylo prokázáno, že během NASH se zvyšuje exprese endoglinu v játrech, což má za následek zvýšení hladiny solubilního endoglinu v plazmě. Nadměrné zvýšení hladiny solubilního endoglinu má vliv na zhoršení již vyvinutého NASH zvýšením obsahu cholesterolu a triacylglycerolů v játrech⁽²⁾.

Alsamman a kol. ve své studii pozorovaly expresi mRNA obou forem endoglinu (dlouhé a krátké) v jaterní tkáni získané biopsií od pacientů trpících akutním selháním jater, NASH a HCV infekcí. Jejich výsledky ukazují, že exprese dlouhé formy endoglinu byla významně zvýšená jak u pacientů s akutním selháním jater, tak u chronických jaterních onemocnění, jako je NASH, ve srovnání s kontrolními vzorky zdravých jater. Naopak krátká forma endoglinu byla ve zvýšené míře exprimována pouze u vzorků s akutním jaterním selháním, nikoliv u pacientů trpících NASH nebo HCV infekcí. Toto zjištění ukazuje na rozdílnou regulaci jednotlivých forem endoglinu, což je důležité pro zhodnocení funkce obou forem. Exprese endoglinu v játrech byla zaznamenána v hvězdicových buňkách a Kupfferových buňkách, hepatocyty endoglin neexprimují. V další studii se snažili prokázat vliv endoglinu na jaterní fibrózu u myši s knockoutovaným endoglinem v jaterních hvězdicových buňkách a zjistili, že nedostatek endoglinu zhoršuje jaterní fibrózu. Endoglin v hvězdicových buňkách posouvá signalizaci TGF- β z ALK-5 a SMAD 2/3 směrem k ALK-1 a SMAD 1/5/8. Zvýšená exprese dlouhé formy endoglinu v této buněčné linii vedla ke snížení exprese kolagenu po stimulaci TGF- β , což naznačuje ochranný účinek endoglinu při jaterní fibróze. V nepřítomnosti endoglinu se pravděpodobně podporuje signalizace TGF- β přes dráhu zahrnující SMAD 2/3, která podporuje tvorbu kolagenu⁽¹⁰⁾.

Ve studii prováděné Igreja Sá a kol. byly myši krmeny dietou s vysokým obsahem nasycených tuků, fruktózou a vysokým obsahem cholesterolu. Dieta vyvolala u myši hypercholesterolémii a vedla ke zvětšení jater ⁽²⁾. Tyto myši vykazovaly zvýšené hladiny myšího solubilního endoglinu ^(1; 2). Navíc zmíněná dieta zvýšila expresi mRNA transkripčního faktoru tzv. Krueppelova faktoru 6 (Klf6), který reguluje expresi endoglinu a to o 166 % a množství samotného proteinu endoglinu v játrech se zvýšilo o 42 %. Zvýšila se také exprese mRNA profibrotických markerů, jako je například TGF- β . Zároveň myši vykazovaly zvýšený obsah cholesterolu a triacylglycerolů v játrech a LDL cholesterolu v plazmě. Z histologického hodnocení řezu jater bylo patrné, že dieta vyvolává steatózu jater s mírnou indukcí fibrotického procesu ⁽²⁾.

Ve studii se také prokázalo, že Klf6 zvyšuje expresi metaloproteázy MMP-14, takže se spolu zřejmě podílejí na tvorbě solubilního endoglinu během NASH. Proto Igreja Sá a kol. navrhují, že zvýšená hladina solubilního endoglinu by mohla sloužit jako cirkulující biomarker pro NASH ⁽²⁾. Jiná studie vedená Doležalovou a kol. tvrdí, že vyšší hladina cirkulujícího endoglinu při hypercholesterolémii aktivuje mechanismy vedoucí k redistribuci cholesterolu z plazmy do hepatocytů, což vede ke snížení hladiny LDL cholesterolu v plazmě ⁽¹⁾.

1.3.6 Endoglin a hepatocelulární karcinom

Studie zabývající se endoglinem v souvislosti s karcinogenezí nádorů můžeme pomyslně rozdělit do dvou skupin, kdy se první skupina zaměřuje na endoglin jako na marker angiogeneze a na jeho roli v diagnostice a prognostice, zatímco druhá skupina zkoumá jeho proangiogenní či antiangiogenní působení ⁽⁴⁾.

U hepatocelulárního karcinomu má angiogeneze velký význam v časně progresi onemocnění, pooperační recidivě a metastázování nádoru. Nově vznikající karcinom trpí nedostatkem živin, a tak nádorové buňky produkují hypoxií indukovaný faktor 1 α , který stimuluje novotvorbu cév směrem k nádoru, tyto buňky mohou případně částečně tvořit stěny cév ⁽³⁾. Nádorové buňky jsou také schopny vytvářet tzv. vaskulogenní mimikry – avaskulární kanálky, kterými protéká krev - jinými slovy, jedná se o proces, při kterém vznikají z nádorových buněk nové cévy ^(3; 4). Přítomnost vaskulogenních mimiker je u HCC považována jako negativní prognostický marker ⁽⁴⁾.

Zdravá jaterní tkáň je vyživována portální žilou, HCC je vyživován především jaterními tepnami ⁽³⁾. Z toho lze vyvodit, že rozvoj vaskularizace umožňuje rozvoj karcinomu a můžeme ji považovat za prognostický ukazatel ^(3; 4).

V nově vytvořených mikrocévách HCC je hojně exprimován endoglin, což na druhou stranu umožňuje kvantifikovat nádorovou angiogenezi pozorováním tzv. mikrovaskulární hustoty ^(3; 4), u které se endoglin jeví jako ideální ukazatel. Umožňuje znázornit endotelové buňky nově vytvořené nádorové vaskulatury a koreluje s expresí endoteliálního růstového faktoru. Hustota nově vytvořených mikrocév se jeví jako další užitečný prognostický marker, vysoké hodnoty mikrovaskulární hustoty představují negativní prognostický marker – pooperační prognóza pacientu s HCC s nižší mikrovaskulární hustotou (vycházející z hodnocení endoglinu) byla významně lepší než u pacientu s vysokou hustotou mikrocév. Angiogeneze u HCC je dynamická a exprese endoglinu se liší v závislosti na stádiu onemocnění i mezi maligními a benigními lézemi. Eng je exprimován jak v tkáni HCC, tak i v prekancerózních ložiscích, tedy i u jater zasažených fibrózou ^(3; 4). Endoglin účastní se neovaskularizačního procesu u hepatocelulárního karcinomu je markerem buněčné proliferace pro vaskulaturu nádoru. Některé buňky odvozené od karcinomu jsou schopné produkovat *in vivo* endoglin, to má za následek aktivaci endoteliálních buněk, které jsou označovány jako nádorové endoteliální buňky. Tyto nádorové endoteliální buňky exprimují endoglin, a také další geny podílející se na angiogenezi, které zvyšují tvorbu „trubicových formací“ a migraci buněk. Pro časnou angiogenezi u HCC je charakteristická hypoxie a kyselé mikroprostředí, které podporuje „pučení“ endotelu, následně se zvyšuje exprese hypoxií indukovaného faktoru 1 α a endoglinových promotorů ⁽³⁾.

Nejvyšší exprese endoglinu je u dobře diferencovaných nádorů a naopak u málo diferencovaných nádorů je exprese endoglinu nízká ^(3; 4). Asi u 75 % pacientů s málo diferencovaným HCC byla exprese endoglinu velmi nízká, v dané studii označena jako „negativní“. Z této studie vyplývá, že se závažnou progresí karcinomu se exprese endoglinu snižuje ⁽⁴⁾. Endoglin se u HCC vyskytuje hlavně na periférii nádoru v jeho mikrocévách a ligand TGF- β 1 se nachází v nádorových hepatocytech. Podle studie Benetti a kol. od HCC odvozený TGF- β 1 pracuje jako chemoatraktant pro endoteliální

buňky, které exprimují endoglin a také jako promotor nádorové angiogeneze. Yagmur a kol. naznačují, že endoglin by mohl být potencionálním komplementárním biomarkrem pro hodnocení rizika hepatocelulárního karcinomu u pacientů s cirhózou jater ⁽³⁾.

U pacientů s HCC byl zaznamenán i cirkulující sEng ve zvýšené koncentraci, který by mohl mít potenciál jako diagnostický či prognostický faktor. Tento sEng se uvolňuje jak z endoteliálních buněk, tak z buněk rakovinných ^(3; 4). Cirkulující sEng byl ve zvýšené koncentraci zaznamenán i u pacientů s cirhózou jater s rizikem HCC a studie Teama a kol. zjistila, že zvýšený Eng a mRNA TGF- β podporují hepatokarcinogenezi a tím zvyšují riziko hepatocelulárního karcinomu. Studie Li a kol. prokázala, že endoglin podporuje invazi a metastázování buněk HCC pomocí zvýšené exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Tato studie také prokázala významnou korelaci mezi expresí endoglinu a diferenciací a metastázováním nádoru ⁽³⁾.

Nadměrná exprese endoglinu v tkáních, které nebyly doposud zasaženy nádorem naznačuje, že toto mikroprostředí podporuje rozvoj HCC. Z těchto důvodů se zdá být užitečné stanovení jak tkáňové exprese endoglinu, tak hladiny sEng v krvi pro diagnózu ale i prognózu onemocnění ^(3; 4).

Bylo prokázáno, že jádrový (kapsidový) protein viru hepatitidy C (HCV) stimuluje endoglinovou signální dráhu a podporuje roli endoglinu v kmenových rakovinných buňkách asociovaných s HCV, kdy v těchto buňkách je významně zvýšená regulace endoglinové mRNA projevující se zvýšenou expresí endoglinu na buněčném povrchu buněk HCC typu HepG2.

Nádorové endoteliální buňky exprimující endoglin byly v porovnání s normální endoteliální tkání exprimující endoglin odolnější vůči apoptóze a měly silnější proangiogenní vlastnosti, zároveň také vykazovaly silnou adherenci k nádorovým buňkám a lepší přežití v prostředí nádoru ⁽³⁾.

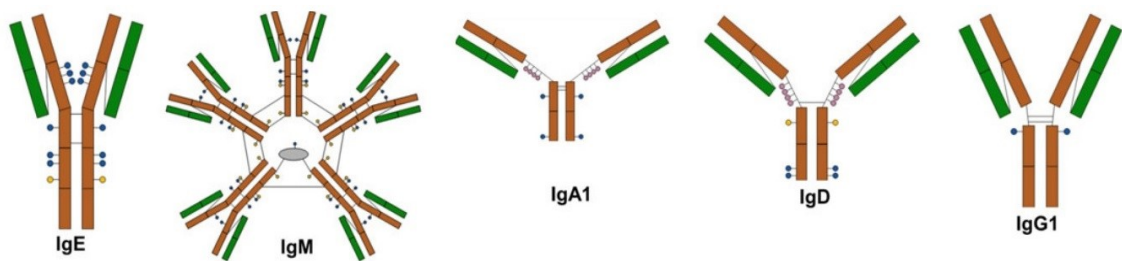
1.4 Protilátky

Imunoglobuliny neboli protilátky jsou nezbytnou součástí imunitního systému. Produkují je B-lymfocyty po tzv. antigenní stimulaci. Tyto diferencované bílé krvinky jsou označovány jako plazmatické buňky ⁽⁴⁹⁾. Protilátky zastávají různé funkce jako je neutralizace, opsonizace ^(50; 51), aktivace komplementu nebo blokace adheze mikroorganismů ⁽⁵¹⁾.

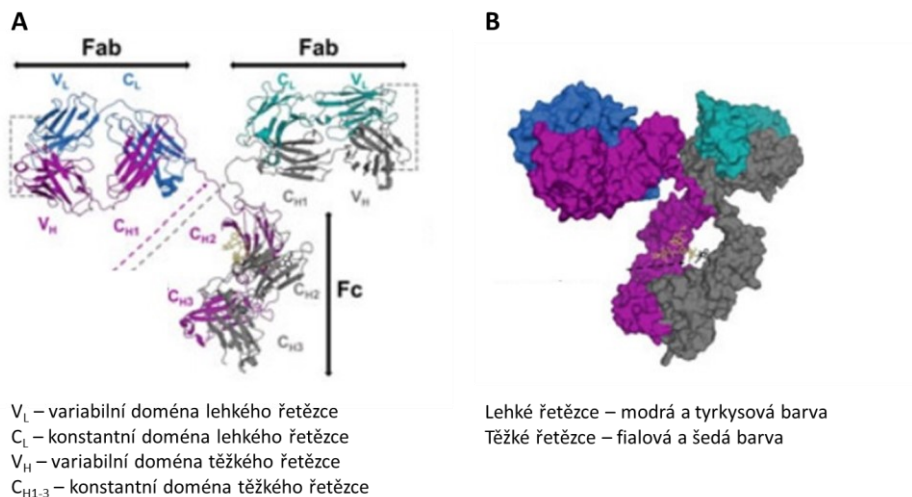
Z biochemického hlediska se jedná o glykoproteiny ⁽⁴⁹⁾, které jsou tvořené čtyřmi polypeptidovými řetězci – dvěma těžkými a dvěma lehkými κ nebo λ (Obr. 12 B) – propojené disulfidickými můstky mezi dvěma molekulami cysteinu ^(49; 50; 51; 52). Tyto můstky se nachází i uvnitř řetězců, čímž vznikají kruhové smyčky zvané domény ^(50; 51; 52). Molekula imunoglobulinu připomíná tvarem písmeno Y.

Polypeptidové řetězce se vždy skládají z variabilní a konstantní domény. Variabilní doména lehkého a těžkého řetězce spoluutváří paratop, přes který se vážou na antigeny. Vrchní část molekuly tvořená jednou variabilní a jednou konstantní doménou lehkého a těžkého řetězce se nazývá Fab fragment (Obr. 12 A). Obsahuje specifické uspořádání aminokyselin, které slouží jako vazebné místo pro antigen, tzv. paratop. Paratop je specifický pro určitou část antigenu, tzv. epitop. Jedná se o extrémně variabilní místo, díky kterému jsou imunoglobuliny schopny rozeznat milióny různých antigenů ve stejné třídě protilátek.

Několik konstantních domén tvořených zase na druhém konci dvou těžkých řetězců vytváří Fc fragment (Obr. 12 A). Molekula imunoglobulinu se přes Fc konec může vázat na Fc receptory buněk a umožňuje tak určité specifické funkce protilátky ^(49; 52) jako je např. aktivace komplementu, opsonizace atd. ⁽⁵¹⁾ a také komunikaci s ostatními složkami imunitního systému ^(49; 50; 53). Fc části protilátek se mohou lišit ve svých tzv. konstantních doménách – na základě těchto rozdílů rozlišujeme pět tříd protilátek – IgA, IgD, IgE, IgG a IgM (Obr. 11) ^(49; 50; 51).



Obrázek č. 11 Třídy protilátek (převzato z Kapingidza et al, 2020⁴⁹)



Obrázek č. 12 A Fab a Fc části protilátky IgG; B 3D struktura protilátky IgG (převzato z Kapingidza et al, 2020⁴⁹)

1.4.1 Vazba protilátek

Protilátky se svým vazebným místem tvořeným Fab fragmentem nazývaným paratop specificky vážou na antigenní determinantu neboli epitop antigenu. Antigen je látka schopná vyvolat v organismu specifickou imunitní reakci. V případě, že je tvar a fyzikálně-chemické vlastnosti epitopu a paratopu komplementární, vytvoří se mezi nimi síť nekovalentních vazeb mezi aminokyselinami s různými postranními řetězci, čímž vznikne imunokomplex antigenu a protilátky, který má využití v imunoterapii nebo imunodetekci. Nejčastěji se jedná o slabé vazebné interakce, mezi které řadíme van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce a elektrostatické síly. Označením pro pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou je pojem afinita. Čím je afinita vyšší, tím je vazba pevnější⁽⁵¹⁾.

1.4.2 Příprava protilátek

Protilátky pro výzkumné účely se získávají nejčastěji několika způsoby. Imunizací zvířat s následnou izolací ze séra se připravují polyklonální protilátky. Polyklonální protilátky mají schopnost vázat se na více antigenních determinant cílového proteinu, tím se zvyšuje jejich šance navázat se na specifický epitop. To dělá polyklonální protilátky citlivější a stále tak využívají pro řadu aplikací ^(54; 55).

Dále přípravou hybridomu nejčastěji po imunizaci myši nebo králíka, ze kterých se odeberou plazmatické buňky produkující potřebné protilátky, se spojí s nádorovými buňkami. Získávají tak schopnost se neomezeně množit a pak se mohou protilátky vyrábět opakovaně kultivací klonu. Takové protilátky nazýváme monoklonální a postup jejich přípravy poprvé představili Köhler a Milstein ⁽⁵⁶⁾. Monoklonální protilátky mají přesně definovanou strukturu a jsou tvořeny klonem jedné buňky. Má schopnost vázat se na jeden konkrétní epitop sledovaného proteinu ^(51; 55). Ve zdravotnictví i ve výzkumu se využívají pro jejich schopnost se zcela jednoznačně navázat na vybrané buněčné znaky ⁽⁵¹⁾.

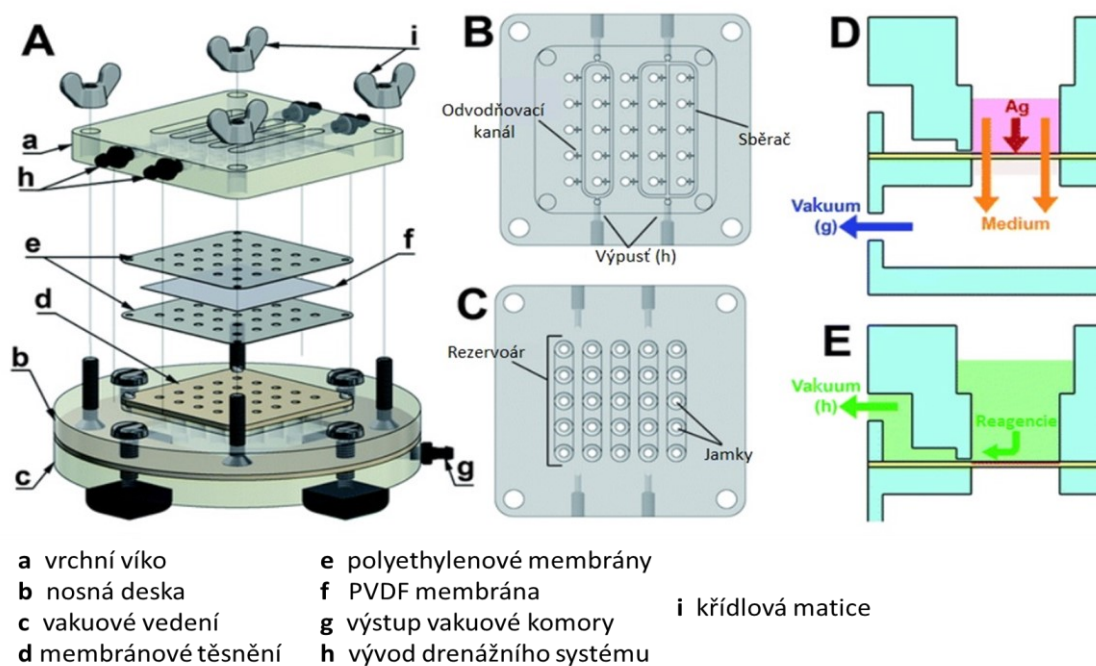
V posledních letech se rozvíjí výroba rekombinantních protilátek. Jedná se o fragmenty protilátek (např. Fab nebo ScFv fragment), které jsou vysoce specifické a citlivé. Jsou vytvářeny synteticky, *in vitro* se stanoví sekvence dané protilátky a vytvoří se gen, který je přenesen, neboli transfekován, do buněčné kultury. Buňky následně začnou produkovat cílovou rekombinantní protilátku. Buňky mohou být savčího, hmyzího, bakteriálního původu se zajišťující potřebnou posttranslační modifikaci protilátky. Výhodou těchto protilátek je jejich reprodukovatelnost a kontrola nad strukturou protilátky, lze se vyhnout použití laboratorních zvířat a také změnou hybridomů u dlouhodobé kultivace apod. S tím souvisí vysoká reprodukovatelnost a specifita protilátek ^(56; 57; 58).

1.4.3 Imunodetekce

Ve výzkumu se můžeme setkat s pojmy primární a sekundární protilátka. Primární protilátka je ta, která se přímo váže na epitop proteinu, který chceme detekovat. Sekundární protilátka rozpoznává část použité primární protilátky, nejčastěji Fc fragment určité zvířecí protilátky a váže se na ni. Primární protilátky bývají monoklonální, rekombinantní nebo polyklonální a sekundární nejčastěji polyklonální ⁽⁵⁵⁾.

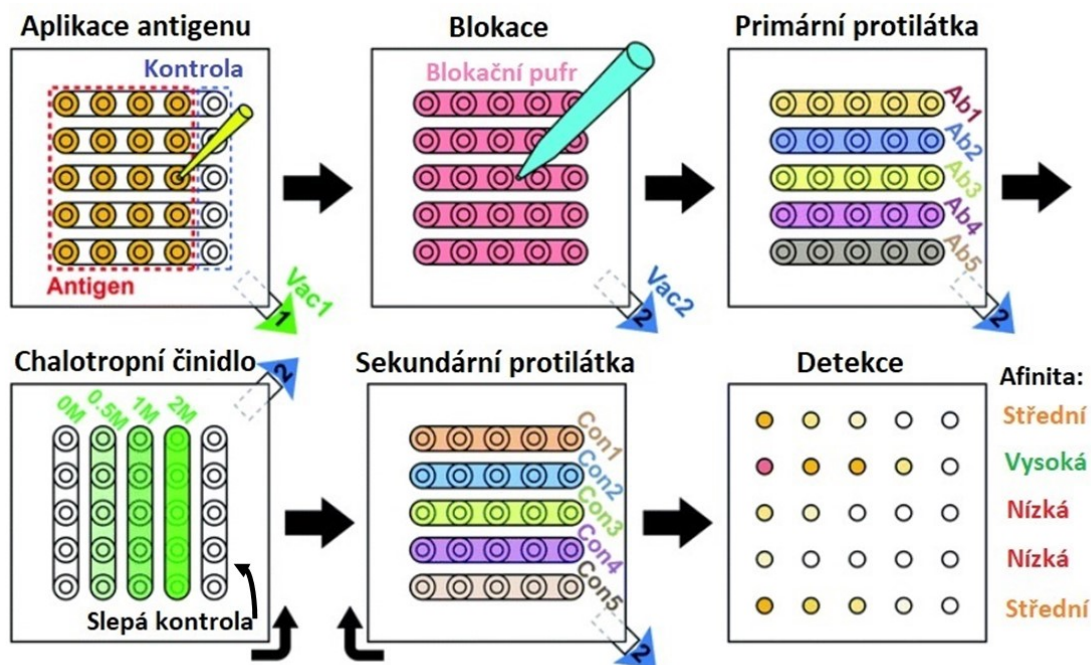
1.5 Dot blot – affiblot

Affiblot je blotovací metoda založena na bázi dot blotu, který je rychlý, jednoduchý a levný. Využívá interakcí mezi bílkovinnými molekulami, z nichž je jedna imobilizovaná na membráně a druhá je v roztoku ⁽⁵⁹⁾. Používá se buď pro kvalitativní stanovení více vzorků najednou, ale lze ho využít i pro kvantitativní analýzu, tedy při stanovení koncentrace sledovaných látek. Metoda funguje na principu imunanalytických metod založených na interakci antigen-protilátka, kdy se antigen váže fyzikálně-chemickými silami na blotovací membránu, po blokaci se membrána inkubuje s primární a následně sekundární protilátkou. Poté následuje detekce sekundární protilátky kolorimetrickou, chemiluminiscencí, fluorescencí či jinou amplifikační metodou ^(59; 60). Cílem stanovení touto metodou mohou být purifikované či rekombinantní peptidy, proteiny, ale i celá bakteriální buňka. V případě affiblotu lze zařízení využít nejen jako dotblot ale i při sledování afinity a zkřížené reaktivity protilátky ⁽⁶⁰⁾.



Obrázek č. 13 A Konstrukce zařízení; B Spodní strana víka; C Horní strana víka s 1 ml rezervoáry; D Umístění antigenu; E Odvod roztoku s reagensii pomocí drenážních kanálků do výpusti (převzato z Svobodova et al, 2021⁶⁰)

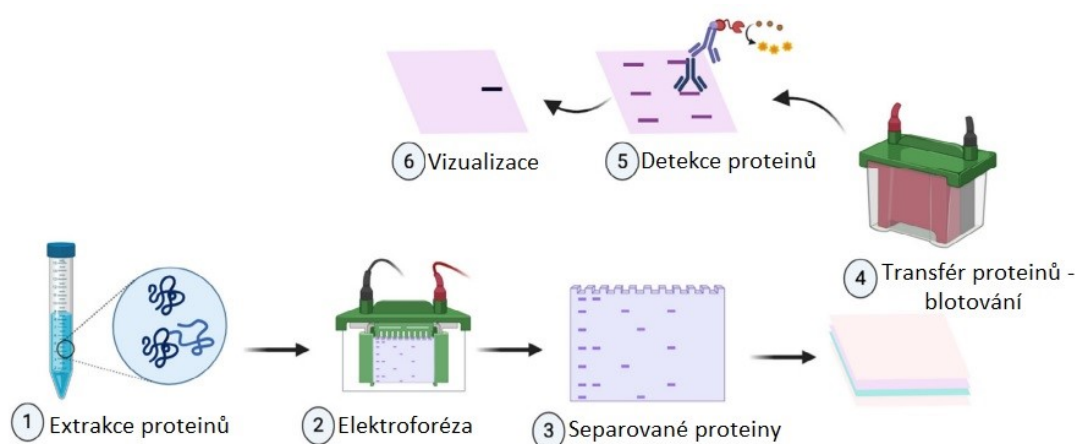
Affiblot je patentově chráněného zařízení, které je tvořeno třemi plastovými komponentami opatřenými kulatými jamkami (5 x 5) – vrchní díl tvoří víko, střední díl nese membránu a spodní díl obsahuje komoru, kde se připojuje vakuum (Obr. 13 A). Na zařízení se nacházejí dva vývody pro vakuum, jedno je na víčku a slouží pro otah reagensii po ukončení inkubace z povrchu membrány zatímco spodní vývod je určen pouze pro nanesení antigenu na membránu. (Obr. 13 D; E). Vrchní víko obsahuje pět rezervoárů, pro každý řádek 5ti jamek a umožňuje aplikaci různých primárních protilátek od různých výrobců a jejich příslušných sekundárních protilátek do každého rezervoáru a pětice jamek separátně (Obr. 13 B; C), což je značnou výhodou této metody. V každém rezervoáru se tedy nachází pět kruhových jamek o průměru 3 mm schopných pojmout 10 – 100 μ l vzorku a jeden rezervoár pojme 1 ml tekutiny. Na spodní straně víka se nachází systém mikrokanálků, které po ukončení inkubace a zapnutí vakua odvádějí reagentie do kolektorových kanálků a následně do odpadu. Další výhodou aparatury je možnost otočení vrchního víka o 90 °C, čímž je umožněna aplikace chaotropního činidla ve směru kolmém k řadám testovaných protilátek, což je krok nezbytný ke stanovení afinity protilátek (Obr. 14)⁽⁶⁰⁾.



Obrázek č. 14 Schéma stanovení principu afinity (převzato z Svobodova et al, 2021⁶⁰)

1.6 Western blot

WB nebo také imunoblot je nejčastěji využívaná metoda v molekulární biologii a proteomice⁽⁶¹⁾. Často se používá pro identifikaci a kvantifikaci specifických proteinů v komplexní směsi látek⁽⁶²⁾. Metoda využívá specifické interakce protilátek s antigeny nacházejících se ve směsi vzorku⁽⁶³⁾.



Obrázek č. 15 Schéma průběhu WB (převzato z Hossein-Meftahi, 2021⁶²)

Zahrnuje několik kroků (Obr. 15). Nejprve je vzorek obsahující směs extrahovaných proteinů separován na polyakrylamidovém gelu na základě velikostí jednotlivých proteinů pomocí elektroforézy, následuje transport separovaných

proteinů z gelu na nitrocelulózovou nebo PVDF blotovací membránu a její následná blokáce při inkubaci s blokačním roztokem. Detekce cílového proteinu se uskutečňuje inkubací membrány s primární a následně sekundární protilátkou. Finální vizualizace se provádí na základě použité sekundární protilátky značené sondou, a to buď kolorimetricky nebo fluorescenčními či luminiscenčními metodami ^(61; 62; 63).

Nevýhodou této techniky je, že se jedná o vícekrokový, časově náročný postup, kdy v každém kroku může dojít k zanesení chyby či odchylky, což značně snižuje spolehlivost a reprodukovatelnost této metody. Zmíněné parametry jsou ovlivněny přípravou vzorku a použitými protilátkami k detekci. Proto je velice důležitá správná příprava vzorku. Vhodným způsobem úpravy vzorků je homogenizační metoda, kdy vznikají homogenáty tkání, při které se účinně uvolňuje intracelulární obsah zlyzovaných buněk ⁽⁶¹⁾.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam použitých protilátek

2.1.1 Primární protilátky

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

Anti-Gapdh králičí mAb (2118, Cell Signaling Technology, Massachusetts, Danvers)

Anti-HuEndoglin/CD 105 králičí pAb (H-300) (sc-20632, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)

Anti-HuEndoglin/CD 105 myší mAb (P4A4) (sc-20072, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)

Anti-mEndoglin/CD 105 kozí pAb (M-20) (sc-19793, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)

Anti-mEndoglin/CD 105 králičí mAb [EPR21846] (ab221675, Abcam, Velká Británie, Cambridge)

Anti-mEndoglin/CD 105 králičí pAb (PA5-79203, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, Waltham)

Anti-mEndoglin/CD 105 myší mAb (P3D1) (sc-18838, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)

2.1.2 Sekundární protilátky

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

Anti-králičí IgG/HRP produkovaná v oslovi, Amersham ECL (NA931-1ML, GE HealthCare, Illinois, Chicago)

Anti-kozí IgG/HRP produkovaná v králíkovi (A5420, Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis)

Anti-králičí IgG/HRP produkovaná v koze (7074S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, Danvers)

Anti-myší IgG/HRP (FAB specifická) produkovaná v koze (A9917-1ML, Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis)

2.2 Seznam použitých proteinů endoglinu

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

Rekombinantní lidský endoglin/CD 105 produkovan v buněčné linii myšního myelomu, Glu26-Gly586, 61kDa, extracelulární doména (1097-EN, R&D Systems, Minnesota, Minneapolis)

Rekombinantní myší endoglin/CD 105 produkovan v bakuloviru, Glu26 – Tyr607, 61 kDa, extracelulární doména (CYT424.10, BioShop, Kanada a USA, Ontario)

2.3 Seznam chemikálií

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

- D** Dodecyl sulfát sodný (20783, SERVA, Německo, Heidelberg)
Dodecyl sulfát sodný (L3771-25G, Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis)
- F** Fosfátové pufované fyziologické tablety (P4417-50TAB, SIGMA Life Science, Massachusetts, Burlington)
- H** Hovězí sérový albumin – lyofilizovaný bez mastných kyselin (PM-T1727/100, Biosera Francie, Nuaille, Pays De La Loire)
- M** Methanol p. a. (67-56-1, Lach-Ner s. r. o., Česká republika, Neratovice)
- N** N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (35925.01, SERVA, Německo, Heidelberg)
- P** Precision Plus Protein™ Standardy dvou barev 500 µl (1610374, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- R** Rozlišovací gelový pufr pro PAGE (1610798, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
40 % roztok bis akrylamidu (1610148, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- S** SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát (34580, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, Waltham)
Sušené odtučněné mléko (9999S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, Danvers)
- T** Thiokyanát amonný (1762-95-4, Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis)
10x Tris/Glycin/Pufr pro WB 5l (pufr pro transfer) (1610771, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
10x Tris/Glycin/SDS 5l (elektroforetický pufr) (1610772, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
Tween®20 (39796.01, SERVA, Německo, Heidelberg)
- Z** Zaostřovací gelový pufr pro PAGE (1610799, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)

2.4 Seznam vybavení

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

- A** Affiblot (Prototyp, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno, ČR)
- E** Extra silný blotovací filtrační papír, 15x20 cm (1703960, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- CH** ChemiDoc MP stanice (BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- I** Immun-Blot® PVDF membrána pro blotování proteinů, 26 cm x 3,3 m, 0.2 µm (1620177, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- M** Mini-PROTEAN® hřeben, 15-well, 1.0 mm, 26 µl (1653360, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
Mini-PROTEAN® slabší skla (1653308, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- S** Skla pro elektroforézu, 1.0 mm integrovaná skla (1653311, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- T** Tenký filtrační papír 7,5x10 cm (1703932, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)

2.5 Příprava použitých roztoků, pufků a gelů

Tabulka č. 1 Příprava pracovního pufku (PBS)

PBS tableta	1 ks
Deionizovaná voda	200 ml

Tabulka č. 2 Příprava promývacího pufku (0,1 % PBST)

PBS	200 ml
Tween	20 µl

Tabulka č. 3 Příprava blokačního roztoku (PBST + 5% BSA)

PBST	50 ml
BSA (sypký prášek)	2 500 mg

Tabulka č. 4 Příprava pufku pro ředění protilátek (0,25% BSA v PBS)

5% BSA	2,5 ml
PBS	47,5 ml

Tabulka č. 5 Příprava chaotropního roztoku pro testování afinity

	1,5M NH₄SCN	1M NH₄SCN	0,5M NH₄SCN
3M NH₄SCN	3 ml	1,33 ml	0,66 ml
PBS	3 ml	2 ml	2 ml

Tabulka č. 6 Příprava rozdělovacích gelů 10%

MiliQ*	4,9 ml
Rozlišovací gelový pufr	2,5 ml
Roztok bis-akrylamidu	2,5 ml
10% Dodecylsulfát sodný (SDS)	0,1 ml
10% Persíran amonný (APS)	0,03 ml
TEMED**	0,015 ml

*Deionizovaná voda; **Tetramethylethyldiamin

Tabulka č. 7 Příprava zaostřovacích gelů 5%

MiliQ	6,15 ml
Zaostřovací gelový pufr	2,5 ml
Roztok bis-akrylamidu	1,25 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,015 ml

Tabulka č. 8 Příprava SDS elektroforetického pufru

Elektroforetický pufr	100 ml
MiliQ	900 ml

Tabulka č. 9 Složení nanášecího pufru a funkce jednotlivých složek

10% SDS	Záporný náboj
Glycerol	Usměrňuje pohyb
2-merkptoethanol	Denaturace
Bromfenolová modř	Barvivo
MiliQ	

Tabulka č. 10 Příprava pufru pro transfer

Pufr pro transfér	100 ml
100% Methanol	200 ml
MiliQ	700 ml

Tabulka č. 11 Příprava promývacího roztoku (TBST)

TBS (10x zředěný) (Tris Buffered Saline)	100 ml
0,1% Tween	1 ml
MiliQ	899 ml

Tabulka č. 12 Příprava TBST-5% mléka

Sušené odtučněné mléko	5 g
TBST	100 ml

2.6 Metodika

Porovnání primárních protilátek proti endoglinu bylo provedeno pomocí affiblotu. Jednalo se o protilátky monoklonální či polyklonální, pocházející z králíka či myši od různých výrobců. Jako konfirmační metoda byl zvolen WB. Každý experiment prováděný metodou affiblot se pro ověření výsledků třikrát opakoval. Výsledky získané pomocí softwaru Imagelab byly dále zpracovány v programu Microsoft Excel.

2.6.1 Metoda affiblot

Nejprve se sestavila aparatura, která se skládá ze tří částí – spodní část s komůrkou na odsátou kapalinu, prostřední část s otvory (3 mm v průměru) uspořádané do 5-ti řad a sloupců ve tvaru čtverce a otočného víka s rezervoáry a jamkami, které kopírují střední část. Víko ve spodní části obsahuje kanálky pro odvod kapalin přes boční hadičky. Při sestavování se prostřední část přišroubovala ke spodní, nvrch se přiložila polypropylenová membrána s vyřezanými body. Následně se přiložila PVDF membrána, která se nechala předem aktivovat v methanolu (cca 2 minuty) a přikryla se další polypropylenovou membránou. Přiložilo se víko a do každého rezervoáru (řádku) se přidalo PBS, to se následně odsálo spodním odsáváním pomocí vakua. Tento krok slouží k ekvilibraci membrány. Do jamek víka se za přítomnosti vakua napipetovaly vzorky podle příslušných schémat. Vždy se pipetovalo do každé jamky 2x 50 μ l vzorku/slepé kontroly, aby se část pipetovaného objemu stačila odsát a nedošlo tak k přetečení vzoru do sousední jamky. Odpojilo se vakuum a zvedly přední kanálky. Následovala blokace pomocí PBST + 5% BSA na 1 hodinu. Blokační roztok se odsál vakuem pomocí kanálků z vrchu. Každý rezervoár se 2x promyl 1 ml promývacího roztoku PBST. Odpojilo se vakuum, zvedly přední kanálky a napipetoval 1 ml potřebné zředěné primární protilátky do rezervoárů. Následovala hodinová inkubace, poté odsátí primární protilátky vrchním vakuem a 7x propláchnutí rezervoárů pomocí PBST. Odpojilo se vakuum, zvedly kanálky a do každého rezervoáru se přidal 1 ml příslušné zředěné sekundární protilátky. Po hodinové inkubaci se opět odsála vrchním vakuem a rezervoáry se 7x promyly PBST, affiblot se demontoval a na PVDF membráně se odstříhl levý horní roh pro snazší

orientaci. Samotná membrána se vložila do vaničky s PBST a nechala se 3x po pěti minutách promývat na třepačce.

K detekci byl využit ChemiDoc MP. Systém je založen na technologii detekce pomocí chlazeného CCD kamery s vysokým rozlišením a citlivostí. Přístroj umožňuje detekci metodou chemiluminiscence, fluorescence, kolorimetrie či denzitometrie. Systém je řízen softwarem Imagelab pro optimalizaci výkonu snímače a pro rychlé, integrované a automatické snímání obrazu. Systém je vybaven režimem akumulace signálů, který stanoví optimální dobu expozice s pořízením požadovaného obrazu vzorku. ^(64; 65)

V této práci probíhala detekce vzorků chemiluminiscencí za použití sekundární protilátky značené enzymem křenová peroxidáza (HRP). Enzym reaguje se substrátem za vzniku produktu, který emituje fotony světla, ty dopadají na detektor a vytváří signál.

2.6.2 Metoda western blot

Tato metoda se prováděla v rámci tří dnů. První den se připravily alikvoty, separační a zaostřovací gely. Druhý den proběhla elektroforéza, transfer na membránu a inkubace membrán s primárními protilátkami. Třetí den se membrány inkubovaly se sekundárními protilátkami, poté následovala detekce na ChemiDoc stanici.

Nejprve se připravily separační (Tab. 6) a dělicí (Tab. 7) gely. Zaostřovací gel, který má nižší koncentraci polyakrylamidu a nižší pH, k tzv. zaostření vzorků, tedy nanesené vzorky se dostanou do stejné úrovně gelu, na pomyslnou „startovací čáru“, tak se do separačního gelu dostanou ve stejný okamžik. Separační gel slouží přímo k rozdělení proteinů na základě jejich velikosti a tvaru.

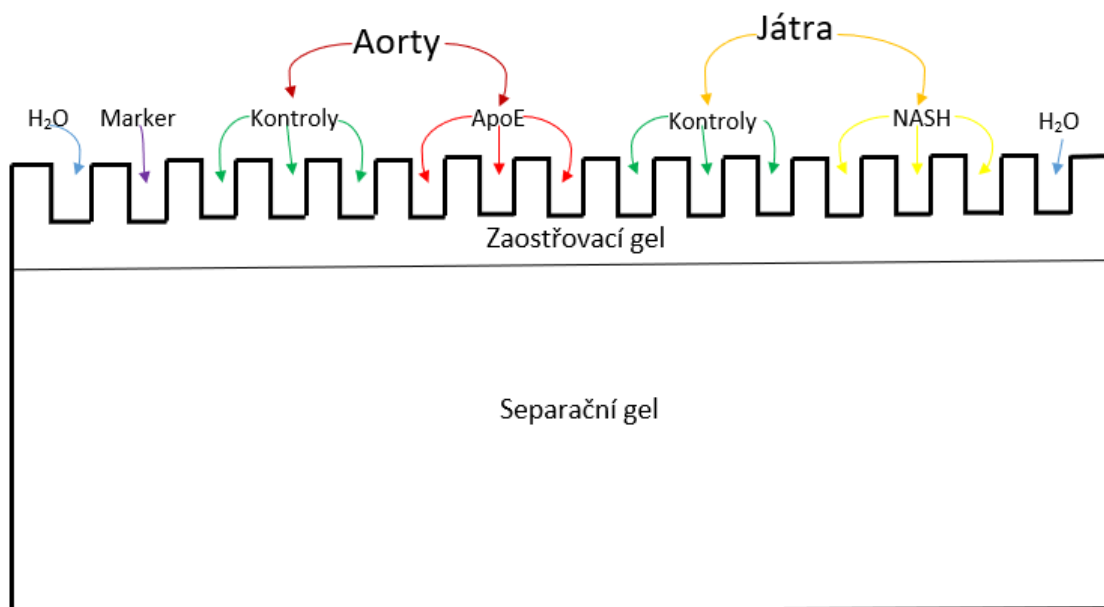
Jedno silnější sklo (se spacerem o tloušťce 1 mm) a jedno krycí sklo se přiložily k sobě tak, aby mezi nimi vznikl prostor o definovaném objemu. Skla se umístila do zeleného držáku se svorkami a následně do stojanu s gumovou podložkou utěšňující spodní hranu mezi skly. Aparatura se pomocí MiliQ otestovala, zda těsní a neprotéká, poté se komůrka mezi skly vysušila filtračním papírem. Do suché komůrky se po okraj zeleného držáku napipetoval připravený roztok pro rozdělovací gel, který se převrstvil isobutanolem (tato polymerizace musela probíhat za nepřístupu vzduchu) a nechal

se 30 minut polymerizovat. Odstranil se isobutanol a zbylý prostor se propláchl MiliQ, opět se vysušil filtračním papírem. Následně se napipetoval připravený roztok pro zaostřovací gel tak, aby mírně přetékal a do roztoku se vložil hřeben pro tvorbu 15-ti dávkovacích jamek. Polymerizace probíhala 30 minut. Gely se uskladnily ve vlhkém ubrousku, který se obalil fólií a uložily se do druhého dne v lednici.

Za laboratorní teploty se nechaly jednotlivě rozmrazit vzorky homogenizovaných myších tkání, ze kterých se připravilo dvanáct alikvotů – 3x tkáň zdravé aorty sloužící jako kontrola, 3x aorta s Apolipoprotein E (ApoE), 3x tkáň zdravých jater (kontrola) a 3x játra s NASH. Vzorky se naředily MiliQ a následně se z každého naředěného vzorku udělaly dva alikvoty, které se ihned umístily do bedny s ledem a následně do mrazáku.

Gely se vložily po dvojicích do držáku elektroforetické vany, vytáhly se hřebeny a do prostoru mezi gely se nalil připravený SDS elektroforetický pufr „running buffer“ (Tab. 8), tím se zkontrolovalo, že aparatura neprotéká.

Vzorky se vytáhly z mrazáku a ke všem se napipetovalo potřebné množství nanášecího pufu „sample buffer“ (Tab. 9) v poměru 1:1 (24 μ l). Sample buffer obsahuje merkaptoetanol, který vytváří v roztoku redukční prostředí a způsobuje rozrušení disulfidických můstků v proteinech. V každém gelu se do jedné pozice aplikoval marker „proteinový žebříček“ (6 μ l markeru + 6 μ l nanášecího pufu) a MiliQ. Schéma aplikovaných vzorků je na obrázku (Obr. 14).



Obrázek č. 16 Aplikace vzorků tkání, markeru a vody do gelu pro WB při detekci myšního endoglinu (mEng)

Do každé jamky gelu se napipetovalo 10 μ l požadovaného vzorku. Připravily se tanky pro elektroforézu, do nich se umístily stojany s gely a celý tank se zalil elektroforetickým pufrům. Tank se připojil ke zdroji a elektroforéza probíhala za použití proudu 30 mA konstantní, napětí 200 V limitní po dobu 1 h 20 min.

Před vlastním přenosem proteinů z gelu na membránu se připravil pufr pro transfer (TB) „transfer buffer“ viz. Tab. 10. Následovala ekvilibrace gelů, kdy se nejprve odřízнул zaostřovací gel a separační gel se na 15 minut ponořil do TB, PVDF membrána se aktivovala 15 sekund ve 100% methanolu, poté se ponořila na 10-15 minut do TB (ekvilibraci membrány).

Následoval WB tzv. mokrou cestou, kdy všechny části „sendviče“ se nechaly nasáknout TB. Kazeta na blot má dvě desky – černou a průhlednou, černá strana byla spodní stranou a na tu se přikládaly další komponenty sendviče v tomto pořadí: černá houba, silný filtrační papír, gel, membrána, 2 ks tenkého filtračního papíru a černá houba. Kazeta se přiložila průhlednou stranou, uzavřela se a umístila do tanku pro WB. Každá přiložená vrstva sendviče se přejela válečkem, aby došlo k odstranění bublin a po celou dobu přípravy se pracovalo ve vaničce naplněné TB. Tank se naplnil TB a připojil ke zdroji. Při WB se aplikoval proud o 300 mA, napětí o 140 V a probíhal 1 h 30 min. Tanky s probíhajícím blotem se ze všech stran chladily ledem.

Následovala příprava promývacího roztoku „TBST“ (Tab. 11) a obarvení membrán v Ponceau S. Obarvené membrány se nejprve omyly v MiliQ a poté v TBST. Poté se odstříhly nepotřebné úseky membrány (zajímal nás úsek od 37 do 250 kDa).

Před inkubací membrán s protilátkami muselo nejprve dojít k zablokování nescifických vazebných míst na membráně pomocí 5% mléka v TBST, které se připravilo podle Tab. 12. Inkubace trvala 1 h. Následně se zředila primární protilátka (Ab) v TBST-5% mléce a proběhla inkubace s membránou po dobu 1h. Po uplynutí dané doby se primární protilátka odsála a uložila do mrazáku, membrána se promyla v TBST a poté inkubovala 1 h se sekundární protilátkou, podle jejího konkrétního ředění. I sekundární protilátka se ředila TBST-5% mlékem. Sekundární protilátka se slila a membrána se promyla v TBST, poté se vložila do transportního boxu s TBST, následně proběhla detekce pomocí ChemiDoc stanice stejně jako u metody affiblot.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro detekci a zobrazení endoglinu v buňkách, tkáních či lyzátech se nejčastěji využívají protilátky, molekuly schopné specificky najít určitou strukturu mezi ostatními proteiny a navázat se na ni. Používají se v metodách založených na imunodetekci, jako je např. imunohistochemie, WB, ELISA či průtoková cytometrie. Problém však představuje jejich případná zkřížená reaktivita nebo malá afinita k cílové struktuře, proto je třeba vhodně vybrat protilátku pro každou aplikaci. V naší práci jsme použili metodu affiblot pro screening a výběr nejvhodnější anti-Eng protilátky pro WB. Nejprve byla provedena optimalizace parametrů affiblotu s lidským endoglinem a protilátkou P4A4. Poté byly otestovány anti-Eng protilátky na kalibrační řadě na myším rekombinantním endoglinu (mEng) v affiblotu a poté pro jejich afinitu k endoglinu za použití chaotropního činidla o rostoucí koncentraci. Následně byly provedeny WB se všemi protilátkami na vzorcích myších tkání a výsledky obou metod byly porovnány.

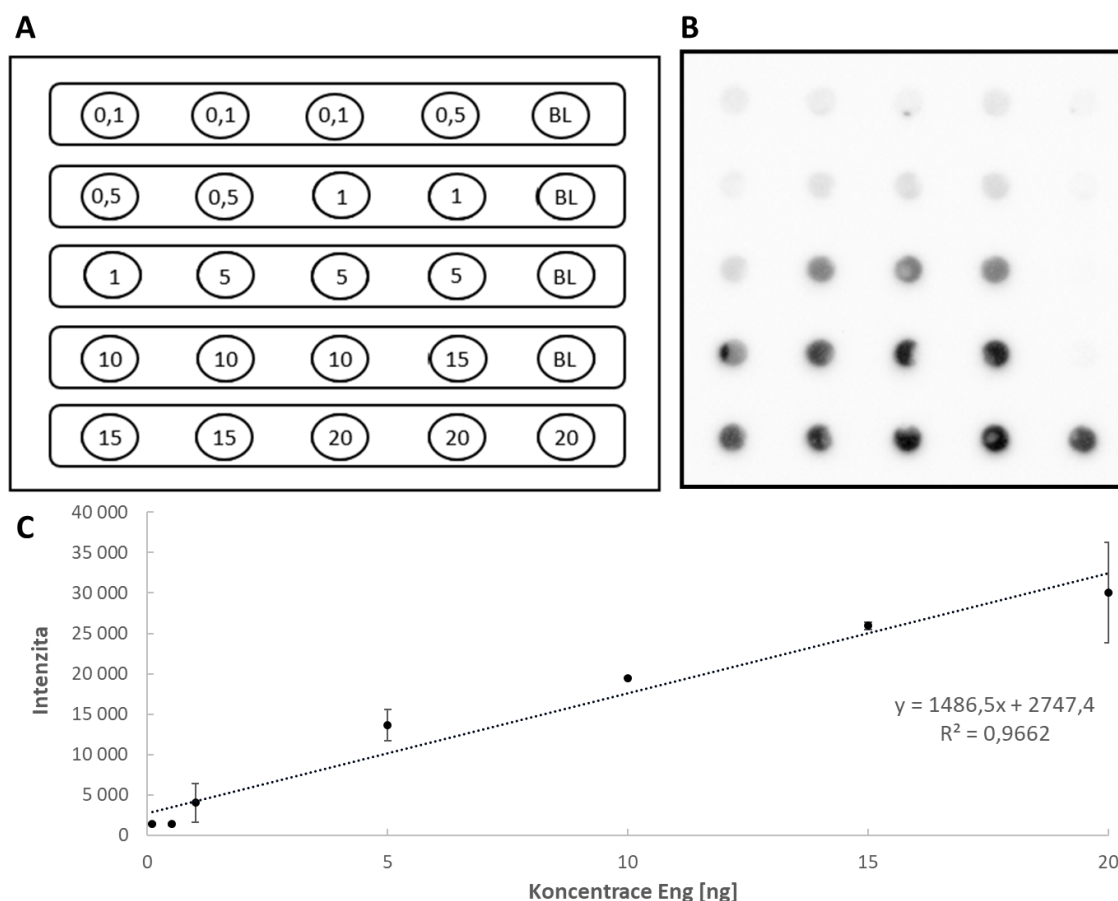
3.1 Optimalizace affiblotu s lidským solubilním endoglinem

Lidský endoglin (HuEng, 61 kDa) byl použit pro optimalizaci metody. Hledalo se optimální pracovní rozmezí koncentrace endoglinu, které by bylo dobře detekovatelné chemiluminiscencí pomocí kitu SuperSignal™ West Pico obsahující chemiluminiscenční substrát.

3.1.1 Kalibrační křivka

Cílem bylo zjistit závislost koncentrace endoglinu na intenzitě skvrn. Prvním krokem bylo vytvořit sedmibodovou kalibrační křivku. K tomu byl použit lidský endoglin, ze kterého se vytvořila kalibrační řada v triplikátu (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 ng/jamku) podle schématu (Obr. 17 A). K detekci byla použita primární protilátka anti-Eng pAb (H-300) v poměru ředění 1:1000 a sekundární protilátka kozí anti-králíčí IgG/HRP v poměru ředění 1:2000.

Výsledky Imagelabu jsou na obrázku (Obr. 17 B). Na membráně je patrné, že s rostoucí koncentrací endoglinu roste i intenzita jednotlivých skvrn. Graficky jsou výsledky zobrazeny v grafu (Obr. 17 C).



Obrázek č. 17 A Schéma nanesení endoglinu (ng/jamku) na membránu; B PVDF membrána vyfocená na Imagelabu; C Sedmibodová kalibrační křivka s použitím lidského endoglinu

Na základě získaných výsledků bylo použito pro další stanovení pracovní rozmezí kalibrační řady 0,5 – 10 ng/jamku.

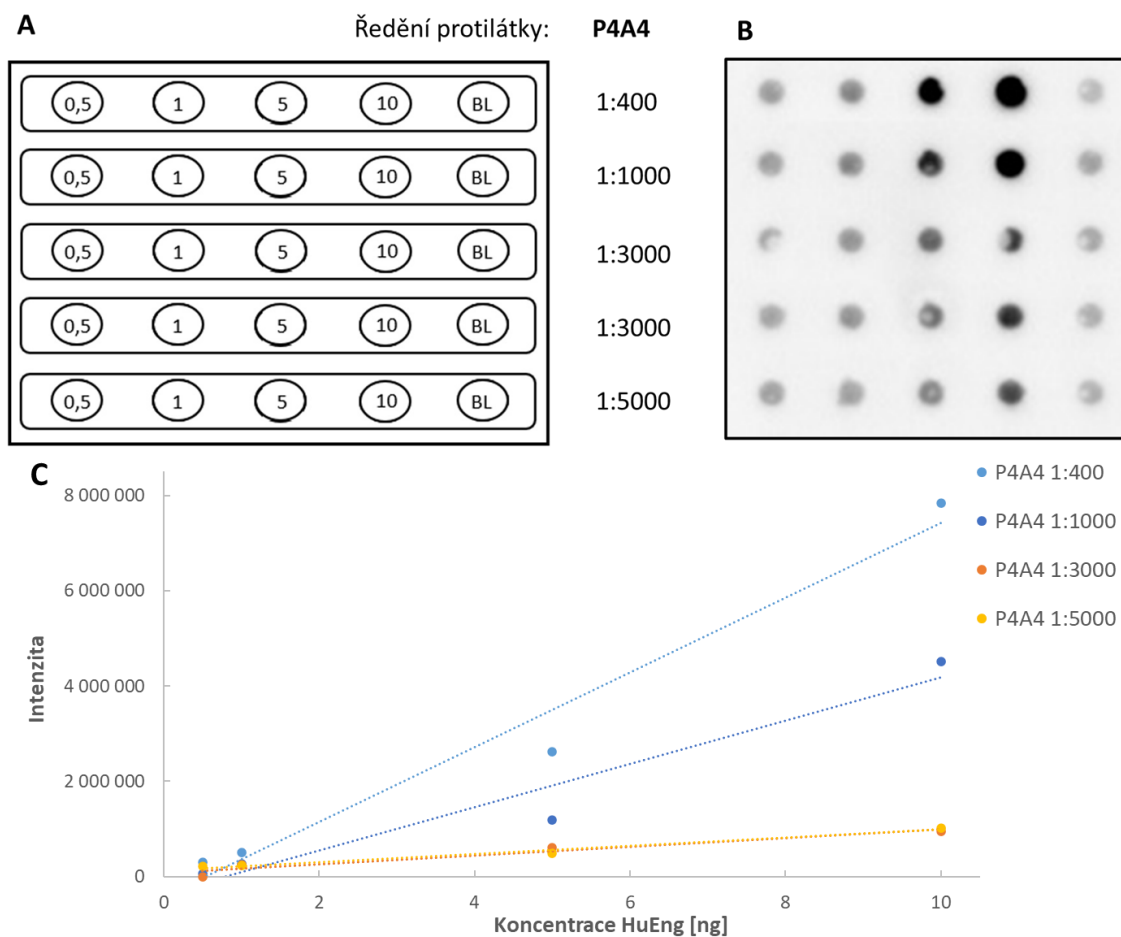
3.1.2 Testování optimálního ředění primární protilátky P4A4

Cílem experimentu bylo najít optimální ředění primární protilátky pro další pokusy. Byla porovnávána intenzita primární protilátky anti-Eng mAb (P4A4) o různých poměrech ředění reagující s lidským endoglinem o různých koncentracích. Jako sekundární protilátka byla použita anti-myší IgG/HRP v poměru ředění 1:5000.

Ve všech pěti řádcích bylo stejné rozložení vzorků lidského endoglinu. V každém řádku byla koncentrace: 0,5–1,0–5,0–10 ng endoglinu na jamku a v poslední pozici byla

slepá kontrola 0,9 μg BSA. V prvním řádku se ředila primární protilátka v poměru 1:1000, ve druhém a třetím řádku 1:3000, ve čtvrtém řádku bylo ředění 1:5000 – tedy největší a v posledním řádku 1:400 – nejnižší ředění. Toto schéma je znázorněno na obrázku (Obr. 18 A).

Nejintenzivnější signál byl dosažen v prvním řádku s nejnižším ředěním primární protilátky (1:400), kde byla protilátka v nejvyšší koncentraci. S rostoucím ředěním protilátky se intenzita skvrn snižovala, jak je patrné na obrázku z Imagelabu (Obr. 18 B). Porovnání intenzit jsou znázorněna v grafu (Obr. 18 C).



Obrázek č. 18 A Schéma nanesení jednotlivých koncentrací sEng (ng/jamku) a aplikace primární protilátky o různých poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány z porovnání intenzit primár. Protilátek; C Grafické znázornění porovnání intenzit signálu protilátky anti-Eng (P4A4)

Ředění 1:400 dává nejvyšší signál, ale zase s ohledem na spotřebu protilátek bylo zvoleno ředění 1:1000, které stále dává dostatečně vysoký signál, ale umožňuje nižší spotřebu nákladných protilátek. Ostatní ředění protilátek už měly významně nižší intenzitu signálu.

3.2 Výběr anti-Eng protilátky pro detekci endoglinu na WB

Při výzkumu patofyziologických procesů a studiu vlivu léčiv u kardiovaskulárních a jaterních onemocnění se na tomto pracovišti používají jako zvířecí model myši. K tomu je potřebná vhodná protilátka, která by byla schopná jednoznačně a specificky detekovat molekulu mEng, a to tkáňového i solubilního. Cílem tedy bylo vybrat vhodného kandidáta mezi různými výrobci a porovnat schopnost protilátek specificky detekovat vybranou molekulu.

3.2.1 Detekce mEng ve tkáni aorty a jater myšího původu metodou WB

V rámci výzkumu onemocnění jater a kardiovaskulárního systému byla sledována změna míry exprese daného proteinu ve tkáních u zdravé a nemocné myši. Ovšem při použití jiných protilátek byly zjištěny nesrovnalosti ve výsledcích odhalující někdy až protichůdné výsledky. Bylo zapotřebí zjistit, která protilátka spolehlivě detekuje endoglin. Vzali jsme proto sadu stejných vzorků jater, aorty a jejich zdravých kontrol a provedli jsme WB analýzu. Detekce byla provedena za použití protilátek od různých výrobců – použily se primární protilátky od ThermoFisher Scientific, Abcam a dvě od Santa Cruz Biotechnology.

Připravilo se pět gelů pro WB. V jednom se detekoval tzv. „housekeeping“ protein – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Gapdh) sloužící jako kontrola, ve zbylých gelech se detekoval zmíněný mEng. Každý gel obsahoval 15 jamek pro vzorky, ty se následně připravily z homogenátů tkání, vždy v triplicátu – 3x zdravá aorta, 3x aorta s ApoE, 3x zdravá játra a 3x játra s NASH. Tyto vzorky, které obsahovaly v sample buffer redukující merkaptoetanol, se napipetovaly do gelů pro WB podle schématu (Obr. 14). V každém gelu byl také aplikován molekulový marker, což je směs proteinů o známé molekulové hmotnosti tvořící žebříček molekulových hmotností pro určení molekulové hmotnosti proteinů ve vzorku. Do postranních jamek se aplikovaly vzorky vody.

Následovala elektroforéza, transfer proteinů z gelů na PVDF membrány a inkubace membrán s příslušnými primárními a sekundárními protilátkami určenými pro chemiluminiscenční detekci.

Při kvantifikaci u WB se jako vnitřní kontrola používá Gapdh, jenž je uznáván jako tzv. „housekeeping“ protein (provozní/konstitutivní protein) mající v buňce bazální funkci, a který je tvořen ve všech typech buněk ve všech vývojových stádiích. Jeho hodnota se používá pro normalizaci koncentrace proteinu ve vzorku při kvantifikaci. Slouží také jako kontrola, že izolace proteinů ze tkání proběhla v pořádku. To, se projeví tak, že na membráně je viditelný jasný pás v oblasti 37 kDa, u kterého se významně nemění intenzita mezi jednotlivými vzorky. WB membrána s Gapdh nám ukázala, že izolace proteinů ze vzorku proběhla kvantitativně, jejich koncentrace v jednotlivých vzorcích se nemění a výsledek je vidět na obrázku (Obr. 19 A). Pro jeho detekci byla použita primární protilátka anti-Gapdh v poměru ředění 1:8000 a jako sekundární protilátka oslí anti-králičí IgG/HRP v poměru ředění 1:10.000.

Na WB s protilátkou od Thermo Fisher (Obr. 19 B) je vidět, že na membráně se nachází velké množství pásů pro každý vzorek s jiným výskytem a intenzitou. Očekávaná molekulová hmotnost pro detekci endoglinu je podle výrobce 95 kDa. Při této molekulové hmotnosti však byl vidět jen slabý pás – proužky vykazovaly slabé signály a měnily se nepravidelně – zejména mezi jednotlivými vzorky NASH byla velká variabilita. Protilátka detekovala mnohem výrazněji jiné proteiny než by odpovídalo molekulové hmotnosti endoglinu. Došlo tedy k nespecifické vazbě protilátky na velké množství neidentifikovaných proteinů. Primární protilátka byla použita v poměru ředění 1:1000 a sekundární kozí protilátka anti-králičí IgG/HRP v poměru ředění 1:2000.

Na WB membráně s protilátkou od Abcam (Obr. 19 C) je vidět jasný pás v oblasti 95 kDa, což je oblast deklarovaná výrobcem pro redukovanou formu endoglinu. Došlo tedy ke specifické vazbě, kdy je zvýrazněn jeden pruh s čistým pozadím, u kterého se nemění intenzita v rámci stejných vzorků. Tato protilátka byla použita v poměru ředění 1:1000 a zcela určitě váže myší endoglin. Jako sekundární protilátka byla opět použita kozí anti-králičí IgG/HRP v poměru ředění 1:2000.

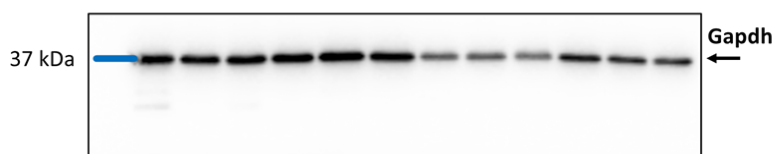
Na membráně s primární protilátkou od Santa Cruz Biotechnology (sc-19793) (Obr. 19 D) byl identifikován jeden pás s čistým pozadím v oblasti 130 kDa. Podle výrobce je molekulová hmotnost redukovaného Endoglinu 84 kDa a neredukovaného 130 kDa, což odpovídá námi zjištěné oblasti. Problém je v tom,

že vzorky jsou zpracovány v redukujícím prostředí s merkaptoethanolem, který rozrušuje disulfidické můstky, tedy teoreticky by se detekovaný endoglin měl nacházet v oblasti 84 kDa, nikoliv 130 kDa. Není tedy jisté, zda protilátka váže specificky endoglin a bude lepší tuto možnost lépe prozkoumat. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:200 a sekundární protilátka (anti-kozí IgG/HRP) 1:5000.

Na WB membráně, kde se testovala protilátka od Santa Cruz (sc-18838) v poměru ředění 1:1000 a sekundární protilátka (anti-myší IgG/HRP) 1:2000 (Obr. 19 E). Na blotu bylo detekováno velké množství proužků v různých molekulových hmotnostech u tkání z aorty a slabší u vzorků jaterní tkáně. Podle výrobce je molekulová hmotnost redukovaného Endoglinu 84 kDa a molekulová hmotnost neredukovaného Endoglinu 130 kDa. U vzorků by se tedy měl výsledný pruh vyskytovat v oblasti 84 kDa. Jediná oblast proužků, které odpovídají této molekulové hmotnosti se nachází u vzorků aorty s ApoE, u ostatních vzorků se v dané oblasti proužky nenacházejí, což není možné, protože endoglin je přítomen vždy všech testovaných tkáních, jen se mění míra exprese. To znamená, že tato protilátka neváže mEng a nelze ji použít k metodě WB.

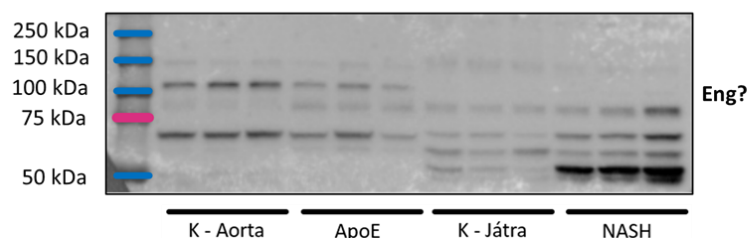
A*Primární protilátka:***Anti-Gapdh**Cell Signaling (#2118)
[1:8000]*Sekundární protilátka:*

Anti-rabbit

GE-HealthCare(NA934-1ML)
[1:10.000]**B***Primární protilátka:***Anti-Endoglin**ThermoFisher (PA5-79203)
[1:1000]*Sekundární protilátka:*

Anti-rabbit

Cell Signaling (#7074) [1:2000]

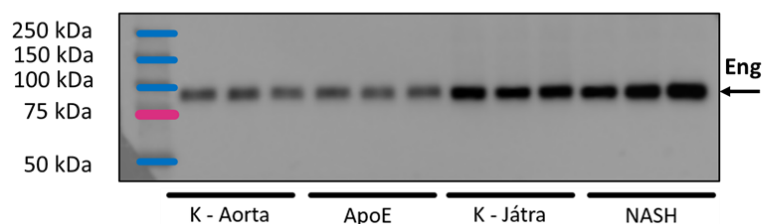
**C***Primární protilátka:***Anti-Endoglin**

Abcam (ab221675) [1:1000]

Sekundární protilátka:

Anti-rabbit

Cell Signaling (#7074) [1:2000]

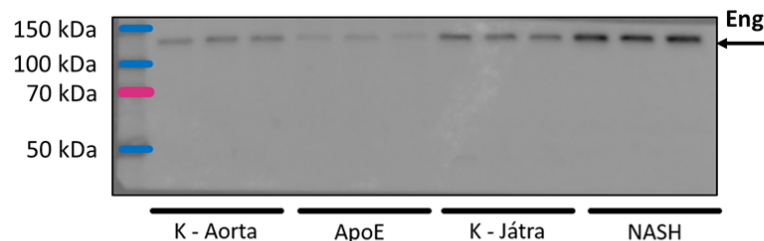
**D***Primární protilátka:***Anti-Endoglin**

Santa Cruz (sc-19793) [1:200]

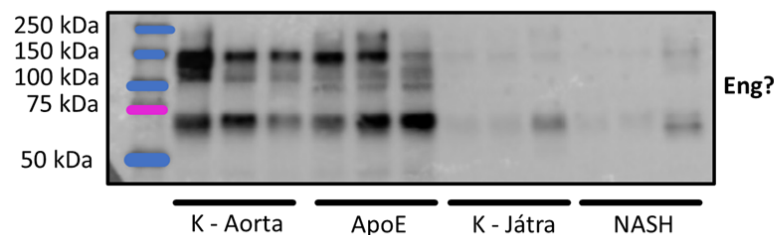
Sekundární protilátka:

Anti-goat

Sigma Aldrich (A5420) [1:5000]

**E***Primární protilátka:***Anti-Endoglin**Santa Cruz (sc-18838)
[1:1000]*Sekundární protilátka:*

Anti-mouse

Sigma-Aldrich (A9917-1ML)
[1:2000]

K – Aorta: aorta od zdravé myši

ApoE: aorta od myši s vyvolanou aterosklerózou

K – Játra: játra od zdravé myši

NASH: játra od myši s vyvolanou NASH

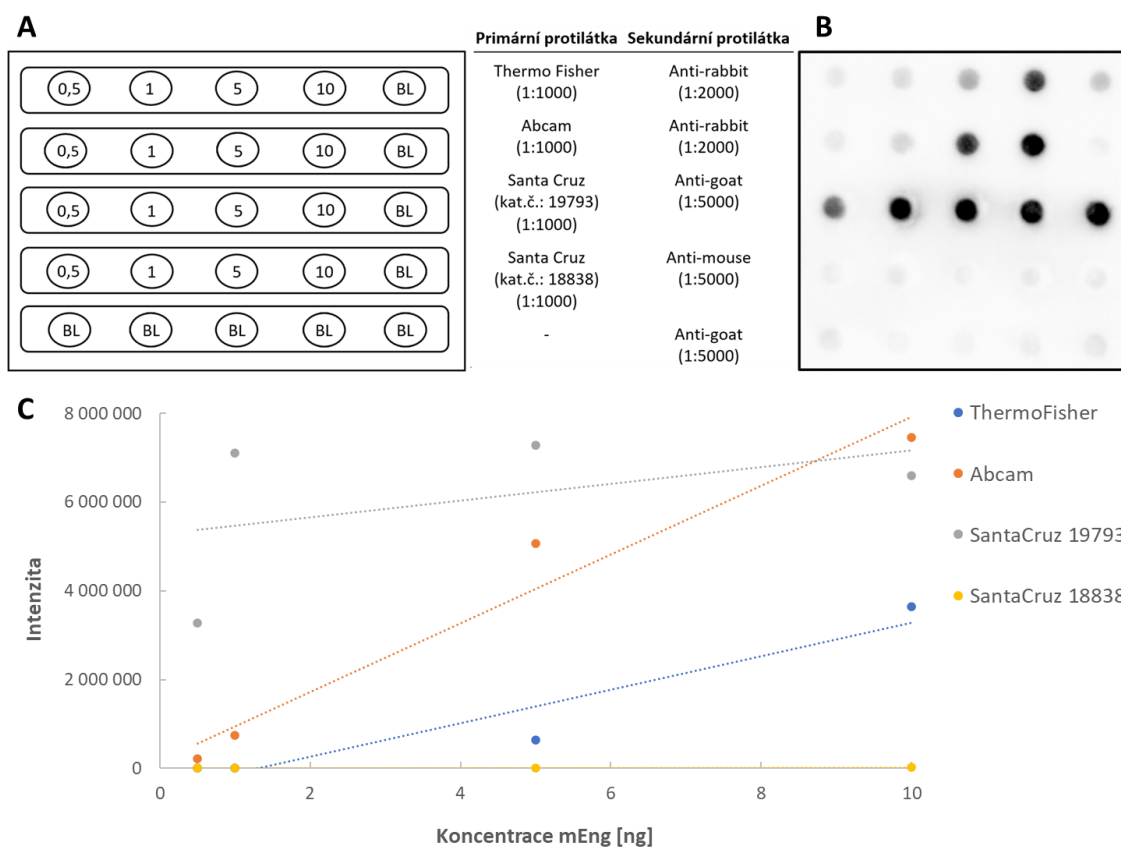
Obrázek č. 19 A Výsledek membrány s kontrolním proteinem Gapdh; B Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od ThermoFisher; C Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Abcam; D Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Santa Cruz Biotechnology (sc-19793); E Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Santa Cruz Biotechnology (sc-18838)

Každá z testovaných protilátek, doporučených pro WB, dává na zcela identických vzorcích naprosto odlišné výsledky. Jediné protilátky, které uměly detekovat jeden konkrétní proužek byly protilátky od Abcam a sc-19793. U těchto dvou protilátek jsme museli zvážit, která z nich správně detekuje endoglin. Není možné, aby na stejných vzorcích za stejných redukujících a dělicích podmínek na elektroforéze byl endoglin detekován jednou při 130 jako výhradně neredukovaná forma a podruhé při 95 kDa jako naopak kompletně redukována forma. Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli specifitu a afinitu jednotlivých protilátek více prozkoumat pomocí affiblotu.

3.2.2 Otestování anti-mEng protilátek na affiblotu

Experiment měl za cíl odhalit schopnost protilátek detekovat rekombinantní mEng (61 kDa) v určitém koncentračním rozmezí metodou dot-blot na affiblotu.

Testovala se stejná řada primárních anti-Eng protilátek jako u WB. K porovnání intenzit signálů použitých protilátek byl použit roztok mEng o různých koncentracích, které byly aplikovány na membránu dle schématu (Obr. 20 A). Poslední řádek byl použit pro slepé vzorky. K detekci signálů každé primární protilátky jsme použily příslušnou sekundární protilátku, jak je znázorněno na obrázku (Obr. 20 A).



Obrázek č. 20 A Znárodnění aplikace mEng (ng/jamku) a použitých protilátek v jejich poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány po chemiluminiscenční detekci; C Grafické znázornění stoupajících intenzit signálů primárních protilátek

Výsledky affiblotu (Obr. 20 B) jsme u jednotlivých protilátek konfrontovali s výsledky na WB. U protilátky Thermo Fisher, která na WB měla řadu nespecifických pruhů, na affiblotu vykazovala citlivou detekci rekombinantního proteinu. Důvody mohou být různé. Jedním z nich je problematika výroby pAb, kdy imunizace probíhá vpravením rekombinantního proteinu. Takové protilátky výborně reagují s rekombinantní formou proteinu, ale mohou mít obtíže s jeho nativní formou ve vzorcích proteinových extraktů z tkáně.

Protílátka od Abcam, která na WB vykazovala pouze jeden pruh odpovídající pozici endoglinu od výrobce, reagovala specificky i v podmínkách affiblotu a její intenzita rostla úměrně s rostoucí koncentrací endoglinu, dokonce i více než u protilátky od Thermo Fisher.

Protílátka od Santa Cruz (sc-19793) v podmínkách affiblotu vykazovala velmi intenzivní signály ve všech pozicích, které ovšem nekorespondovaly s koncentračním gradientem mEng. Dále, velmi intenzivní signál opakovaně vykazoval i slepý vzorek.

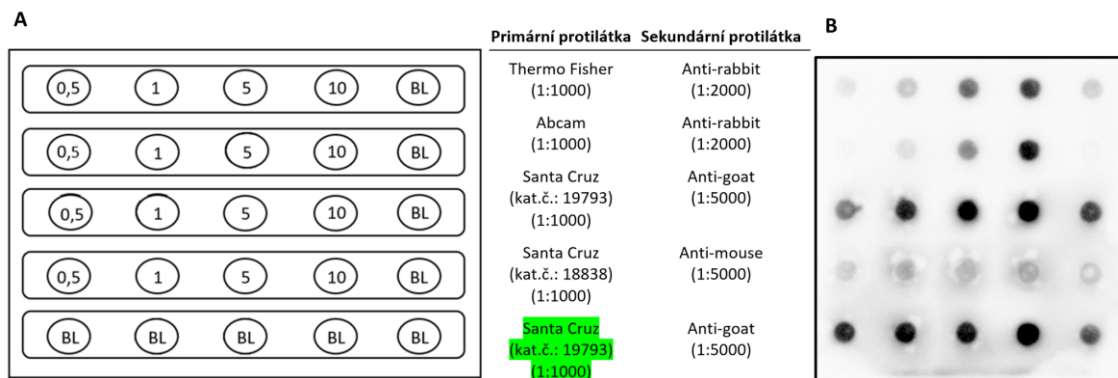
Rozhodli jsme se objasnit, proč k tomuto jevu dochází, zda neprotéká jamka či není problém u sekundární protilátky apod (viz kap. 3.2.4). Tato protilátka na WB vykazovala jediný pruh s endoglinem, ovšem u jiné molekulové hmotnosti než u protilátky Abcam, což je nezvyklé, protože teoreticky by se endoglin měl vyskytovat pouze v redukované formě v oblasti okolo 84-95 kDa a v případě neredukujícího prostředí v oblasti 130 kDa, což nebyl náš případ, protože se do vzorkového pufu na SDS-PAGE používá merkaptoetanol. Není zcela průkazné, že protilátka reaguje s endoglinem, navíc výroba této protilátky byla ukončena a není dostupná na trhu.

U protilátky Santa Cruz (sc-18838) byly ve všech pozicích blotu naměřeny jen slabé signály, které neodpovídaly rostoucí koncentraci mEng. To odpovídá i výsledkům z WB, kde protilátka ve sledované oblasti nedetekovala téměř žádné pruhy. Zato byly detekovány výrazné pruhy v ostatních částech WB. Protilátka zřejmě neváže mEng a není vhodná pro jeho detekci na WB ani affiblotu.

V posledním řádku byly pouze slepé vzorky se sekundární anti-kozí IgG/HRP protilátkou. Naměřené signály byly slabé a byly použity pro výpočty intenzit jednotlivých skvrn u endoglinu. Všechny tyto výsledky jsou znázorněny na obrázku pořízeném v Imagelabu (Obr. 20 B).

Grafické znázornění výsledků je na obrázku (Obr. 20 C). V grafu můžeme pozorovat, že největší citlivosti v detekci protilátek bylo dosaženo s protilátkami od Abcam a od ThermoFisher. Výsledky obou protilátek od Santa Cruz nekorespondovaly s rostoucím koncentračním gradientem endoglinu. Protilátka s sc-18838 nevykazovala téměř žádný signál, protilátka s sc-19793 naopak zase měla ve všech pozicích opakovaně velmi vysoký signál, který neodpovídal rostoucí koncentraci endoglinu. Navíc měl opakovaně vysoké hodnoty slepého vzorku srovnatelné s hodnotami u endoglinu.

Z toho důvodu byl proveden další experiment, ve kterém se v posledním řádku se slepými vzorky použila tato primární protilátka a sekundární protilátka opět anti-kozí IgG/HRP v poměru ředění 1:5000 (Obr. 21 A). Až na tuto změnu se vycházelo ze stejného schématu, jako v předchozím experimentu.



Obrázek č. 21 A Znárodnění aplikace mEng (ng/jamku) a použitých protilátek v jejich poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány po testování intenzit signálů primár. protilátek

Cílem tohoto opakování bylo ověřit, že primární protilátka Santa Cruz sc-19793 skutečně velmi silně reaguje s BSA. To se tímto pokusem potvrdilo, na vyfocené membráně z Imagelabu byly skutečně vidět intenzivní signály této primární protilátky, a to ve všech pozicích s BSA (Obr. 21 B). U této protilátky dochází k nespecifické sorpci na BSA. Otázkou tedy je zda vysoký signál u této protilátky není způsoben tím, že blokace membrány se provádí také BSA a tedy, jestli protilátka nereaguje s tímto proteinem místo endoglinu anebo společně s ním. Výsledky ostatních protilátek byly stejné jako výsledky v předchozím experimentu.

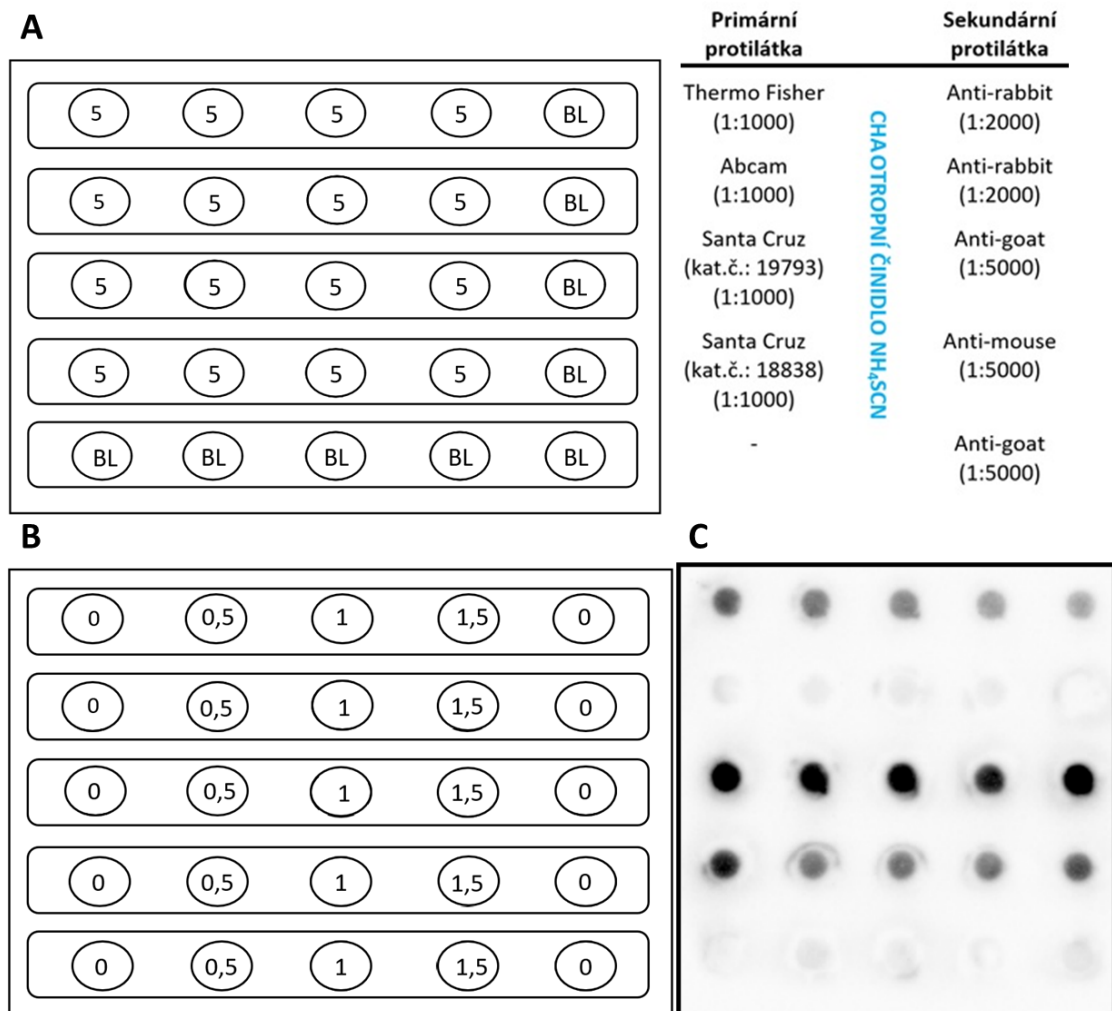
3.2.3 Testování afinity anti-eng protilátek

Cílem experimentu bylo zjistit afinitu primárních protilátek použitých v předchozím experimentu k myším endoglinu. Jako vzorek bylo použito 5 ng/jamku mEng, který se napipetoval do všech pozic, kromě pozic v posledním sloupci a posledním řádku – zde se nacházel slepý vzorek 0,9 μ g BSA. Primární a sekundární protilátky byly napipetovány dle schématu (Obr. 22 A).

Pro měření afinity jednotlivých primárních protilátek jsme použily chaotropní činidlo thiokyanát amonný (NH_4SCN), který byl napipetován kolmo na směr protilátek dle schématu (Obr. 22 B), a jehož koncentrace stoupala v rámci sloupců v rozmezí 0 – 0,5 – 1,0 – 1,5M. V prvním a posledním sloupci nebyl přítomen žádný thiokyanát.

Vzhledem k tomu, že na membránu bylo nadávkováno všude stejné množství endoglinu, by měly mít všechny skvrny stejnou intenzitu. Ovšem, přidáním chaotropního činidla, které má schopnost rozrušit imunokomplex endoglin a anti-Eng

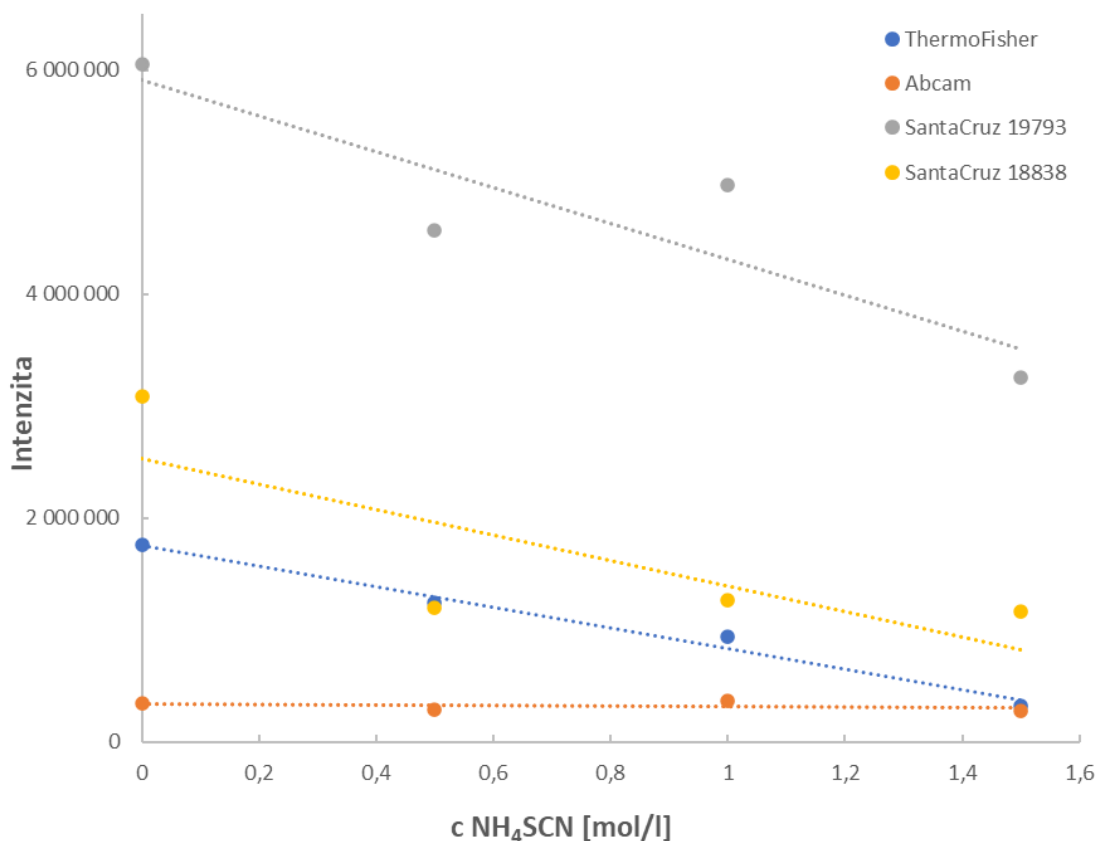
protilátka, se množství imunokomplexu na skvrnách ve sloupci 2-4 bude snižovat úměrně rostoucí molaritě chaotropního činidla.



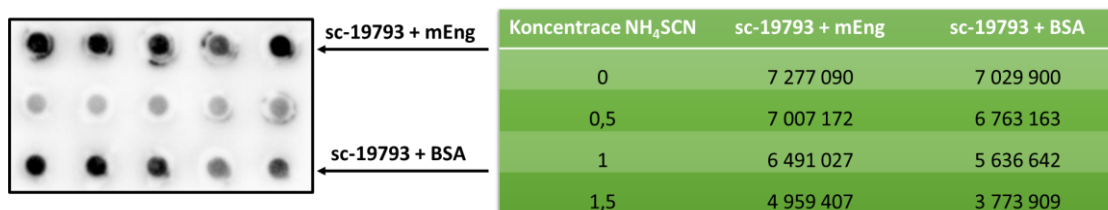
Obrázek č. 22 A Schéma napipetovaného endoglinu a použitých protilátek při testování afinity k mEng; B Aplikace NH₄SCN na PVDF membránu při testu afinity k mEng; C PVDF membrána po stanovení afinity protilátek (mEng)

S rostoucí koncentrací NH₄SCN tedy na obrázku 22 C měla intenzita skvrn u jednotlivých protilátek klesat. Nejsilnější intenzita signálů měla být v první pozici každého řádku, kam se NH₄SCN nepřidává a nejslabší intenzita ve čtvrté pozici každého řádku, kde je naopak koncentrace NH₄SCN nejvyšší a dochází k nejvyššímu stupni rozrušení imunokomplexu. O tom, jak moc bude imunokomplex rozrušen rozhoduje afinita každé protilátky. Čím vyšší afinita, tím vyšší síla vazby mezi antigenem a protilátkou, tím vyšší odolnost vůči chaotropnímu činidlu a tím i vyšší intenzita skvrn. Při porovnání afinity sledujeme jednak intenzitu signálu a potom sklon sestupného trendu u jednotlivých protilátek.

V grafu (Obr. 23) je patrné, že protilátka od Santa Cruz (sc-19793) vázala endoglin velmi silně. S přidávaným NH_4SCN afinita sice mírně klesala, ale naměřené signály byly stále velmi intenzivní. Ovšem protilátka se se stejnou intenzitou vázala i na slepý vzorek s BSA. Zkusili jsme affiblot zopakovat ještě jednou a do jednoho řádku jsme dali pouze BSA a do jiného řádku endoglin. Intenzity obou řádků byly téměř shodné (Obr. 24). Ani chaotropní činidlo nedokázalo vazbu mezi BSA a sc-19793 rozrušit. Ještě jsme zvažovali možnost, že je to spojené se sekundární protilátkou. Výsledky tohoto experimentu jsou v následující kapitole. Protilátka od Abcam z neznámých důvodů nevytvářela žádný signál ani v první jamce, kde by měl být nejvyšší. Pro toto chování nemáme vysvětlení, bylo by třeba provést další experimenty, které mohou být součástí dalších studií. Protilátka od ThermoFisher měla s rostoucí koncentrací chaotropního činidla sestupnou tendenci stejně jako protilátka sc-18838, která v předchozích affiblotech vykazovala vždy jen slabé signály.



Obrázek č. 23 Postupný pokles afinity primárních protilátek k sEng po aplikaci NH_4SCN s rostoucí koncentrací při použití mEng



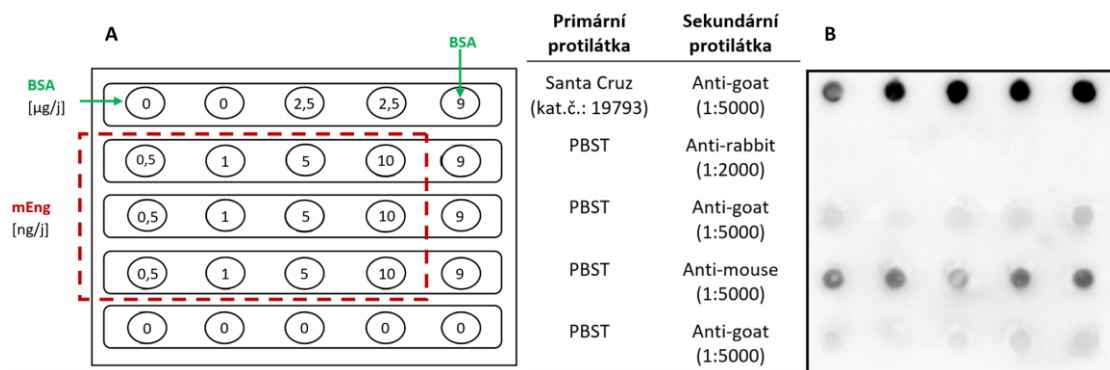
Obrázek č. 24 Výsledek intenzity vazby sc-19793 na mEng a BSA

3.2.4 Ověření nespecifické sorpce sc-19793 a sekundárních protilátek

Cílem experimentu bylo zjistit, proč v předchozích affiblotech vykazovaly slepé kontroly (BSA) v kombinaci s primární protilátkou sc-19793 tak vysoké signály a zároveň vyloučit možnost, že za silnou intenzitu signálů je zodpovědná sekundární protilátka anti-kozí IgG/HRP používaná v kombinaci s touto primární protilátkou. Zároveň se stejným způsobem otestovaly i ostatní sekundární protilátky používané v affiblotech – anti-králíčí IgG/HRP (produkovaná v koze) a anti-myší IgG/HRP. Vzorky a protilátky byly napipetovány dle schématu (Obr. 25 A).

Sekundární protilátka anti-kozí IgG/HRP byla testována v řádku 1, 3 a 5. V prvním řádku dle schématu (Obr. 25 A) byly první dvě jamky bez proteinu, pipetoval se jen pufr. V dalších dvou jamkách bylo 2,5 µg BSA. Zde se mělo ověřit, zda záleží na koncentraci BSA či nikoliv a pipetovaly se obě protilátky – primární i sekundární. Ve všech jamkách byl detekován silný signál navzdory faktu, že v prvních dvou jamkách nebyl pipetován žádný antigen, ovšem tím, že se blokuje 5 % BSA by výsledky odpovídaly faktu, že se protilátka nespecificky váže na BSA. V řádku 3 byl přítomen endoglin v rostoucí koncentraci a byla k němu přidána jen sekundární protilátka. Tento řádek měl prokázat případnou nespecifickou sorpci sekundární protilátky anti-kozí IgG/HRP na endoglin, to se však neprokázalo (Obr. 25 B). V 5. řádku byly prázdné jamky bez BSA či jiného antigenu a byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou. Tento řádek měl prokázat případnou nespecifickou sorpci sekundární protilátky na membránu, to však také nebylo prokázáno. U řádku 3 a 5, kde nebyl žádný obdobný signál jako u řádku 1, tedy nespecifická vazba anti-kozí IgG/HRP protilátky byla minimální a tedy není zodpovědná za silnou intenzitu signálů v pozicích se slepými kontrolami. Z výše uvedených výsledků máme podezření, že protilátka sc-19793

v prostředí affiblotu nespecificky reaguje s BSA, což je potíží, protože se BSA používá při blokaci zařízení. Zkusili jsme proto ověřit tuto vazbu i na WB (viz. kap. 3.2.5).



Obrázek č. 25 A Aplikace BSA (µg/jamka) a mEng (ng/jamka) při testování primární protilátky od Santa Cruz a sekundární anti-goat protilátky; B Výsledek reakce mEng a BSA s primární protilátkou od Santa Cruz a se sekundárními protilátkami

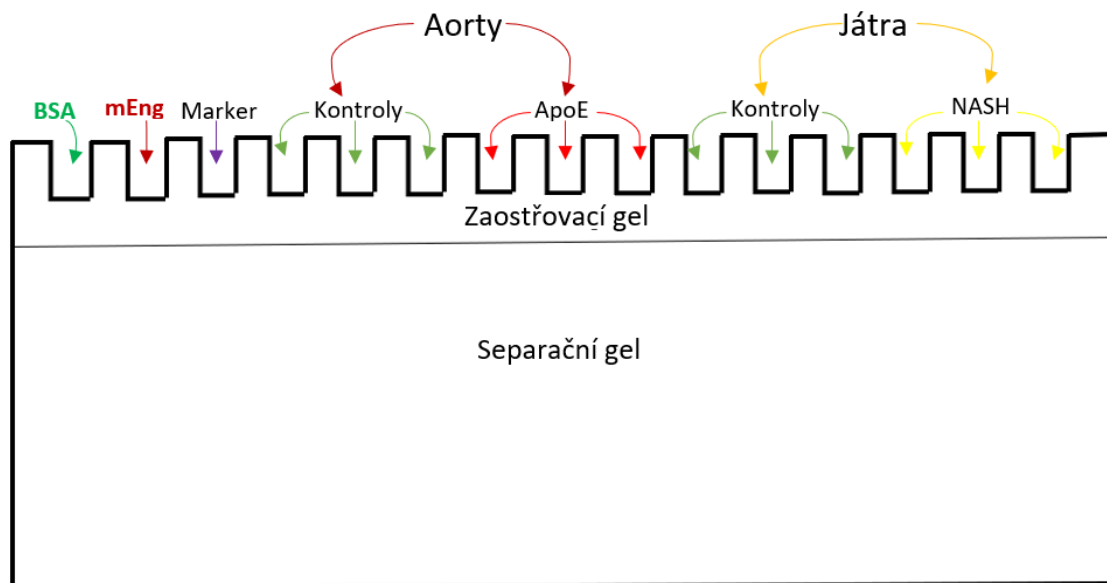
Ve druhém řádku, kde byla aplikována pouze sekundární protilátka kozí anti-králičí IgG/HRP, nebyl žádný signál. Zato u anti-myší IgG/HRP sekundární protilátky byla zaznamenána určitá nespecifická sorpce u endoglinu i BSA, nebyla avšak považována za významnou (Obr. 25 B).

3.2.5 Testování vazby primární protilátky od Santa Cruz na BSA metodou WB

Cílem experimentu bylo ověřit metodou WB, zda se protilátka sc-19793 váže na BSA, neboť v podmínkách dot-blotu vykazovala vždy silné signály v reakci se slepými vzorky s BSA.

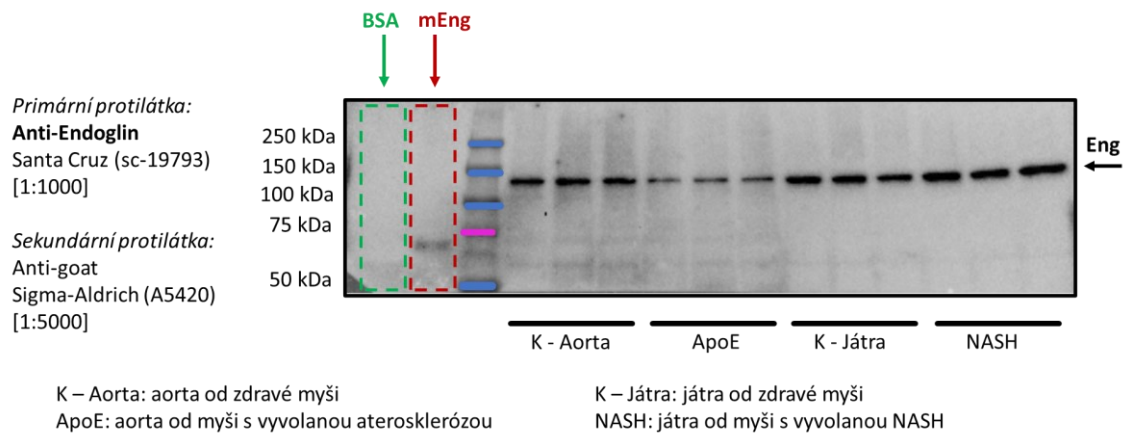
Připravil se gel pro WB. Gel obsahoval 15 jamek pro vzorky, byly použity triplikáty homogenátů tkání 3x zdravá aorta (kontroly), 3x aorta s ApoE, 3x zdravá játra (kontroly) a 3x játra s NASH. Tyto vzorky se napipetovaly do gelu pro WB podle schématu (Obr. 26) V každém gelu byl také aplikován molekulový marker. Do první jamky se aplikoval vzorek BSA (2,5 µg) a do druhé mEng (0,5 µg).

Následovala elektroforéza, transfer proteinů z gelu na PVDF membránu a inkubace membrány s příslušnou primární a sekundární protilátkou pro imunodetekci. Membrána se inkubovala s primární protilátkou sc-19793 v poměru ředění 1:1000 a sekundární protilátkou anti-kozí IgG/HRP v poměru ředění 1:5000. Po dokončení experimentu byla membrána opět vyfocena pomocí softwaru Imagelab.



Obrázek č. 26 Aplikace vzorků tkání, markeru, BSA a mEng do gelu pro WB při detekci BSA primární protilátkou s kat. č. 19793

Na membráně se testovala protilátka sc-19793 a její případná schopnost vázat kromě mEng i BSA. Na Obr. 27 v jamce s BSA se nespécifická sorpce na BSA (MW = 66,5 kDa) z affiblotu nepotvrdila, membrána byla pouze slabě zabarvena. Zato u rekombinantního proteinu se nachází specifický pruh v oblasti redukovaného rekombinantního endoglinu (MW = 61 kDa). Otázka nespécifické sorpce BSA protilátkou sc-19793 nebyla potvrzena. Možným důvodem je jiný postup inkubace a promývání u WB a affiblotu, takže se BSA může vázat ve větším množství na membránu a nespécificky navázaná protilátka se hůře odmyvá z povrchu membrány, tím by mohl vzniknout vysoký signál. Zvláštní je, že odmytí primární protilátky nepomáhá ani chaotropní činidlo, ani zvýšený počet promývacích kroků z pěti na sedm. Na fotce z Imagelabu (Obr. 27) je dále vidět pás v oblasti molekulové hmotnosti kolem 130–140 kDa typický pro endoglin v homogenátech tkání vzorků z aorty a jater. Problematické s touto oblastí detekce je, že endoglin v redukujících a denaturujících podmínkách gelu by se měl vyskytovat spíše jako monomer, nikoliv jako dimer, protože dochází k redukci disulfidických můstků molekuly. Zdá se, že použití této protilátky nelze doporučit, kvůli nejasnostem ohledně nespécifické sorpce a detekce proteinu v oblasti 130–140 kDa. Nicméně výroba a distribuce této protilátky byla stejně v průběhu experimentů zastavena a nebude již dostupná.



Obrázek č. 27 Výsledek membrány s mEng, BSA a primární protilátka od Santa Cruz Biotechnology (sc-19793)

4. ZÁVĚR

Endoglin je transmembránový glykoprotein fungující jako koreceptor pro ligandy nadrodiny TGF- β . Tento protein je exprimován na membráně řady buněk, především na endotelových buňkách hladké vaskulární svaloviny a jaterních buňkách. Extracelulární část endoglinu může být štěpena vlivem metaloproteáz za vzniku sEng, který cirkuluje v krvi. Změny v expresi endoglinu nebo v hladině sEng mohou souviset s výskytem kardiovaskulárních a jaterních onemocnění.

V rámci diplomové práce bylo provedeno porovnání protilátek proti endoglinu za účelem zjištění, která z těchto protilátek nejspolehlivěji detekuje endoglin ve vzorcích myší tkáně. Byly testovány protilátky od Abcam, Thermo Fisher, sc-19793 a sc-18838. Expese endoglinu je odlišná ve zdravé a nemocné tkáni. Například při rozvoji aterosklerózy dochází nejprve ke zvýšení exprese endoglinu v postižené cévě, ale s endoteliální dysfunkcí a následným zvětšováním aterosklerotických lézí dochází ke snížení exprese endoglinu a zvýšení hladiny sEng v plazmě. Pro zdravá játra je důležitá správná expese endoglinu v hvězdicových a Kupfferových buňkách. Jeho zvýšená expese v jaterní tkáni má profibrogenní účinek. U pacientů trpících NASH byla zaznamenána zvýšená expese endoglinu v játrech a také zvýšená koncentrace sEng v cirkulaci oproti jeho hladině v plazmě zdravých lidí. U HCC expese endoglinu kolísá v závislosti na stádiu onemocnění a jeho zhoubnosti. U dobře diferencovaných nádorů byla zaznamenána vysoká expese endoglinu, zatímco u nádorů nediferencovaných je expese tohoto proteinu nízká. Tedy se závažnou progresí karcinomu se expese endoglinu snižuje.

Pro porovnání protilátek a otestování jejich afinity k endoglinu byl využit affiblot. Prototypové zařízení fungující na bázi dot-blotu. Pro ověření, že se použité protilátky vážou na endoglin přítomný v tkáních byl použit WB.

Nejprve bylo zapotřebí zjistit, která z testovaných primárních protilátek spolehlivě váže mEng. K tomu byl využit WB. Protilátky, u kterých byl detekován jediný proužek, byly protilátky od Abcam, která detekovala endoglin v oblasti 95 kDa a sc-19793 v oblasti 130 kDa. Jelikož se experiment prováděl za stejných podmínek, je nemožné, aby každá protilátka detekovala stejný protein v jiné oblasti. Bylo tedy

nezbytné prozkoumat specifitu a afinitu těchto protilátek a zvážit, která z nich skutečně detekuje endoglin. Zbylé dvě protilátky od Thermo Fisher a sc-18838 jsou pro použití na WB nevhodné. Protilátka od Thermo Fisher reagovala nespecificky, vážala se na velké množství neidentifikovaných proteinů. Na membráně zvýraznila velké množství pásů pro každý vzorek s jiným výskytem a intenzitou, v oblasti typické pro endoglin (95 kDa) byl pouze slabý pás. Protilátka sc-18838 zvýraznila velké množství proužků o různých molekulových hmotnostech u tkání z aorty, u vzorků jaterní tkáně byly proužky jen velmi slabé, v molekulové hmotnosti pro endoglin (84 kDa) v podstatě žádné. Endoglin se vyskytuje v obou těchto tkáních, a proto absence proužků u tkání z jater značí, že tato protilátka endoglin neváže.

Před ověřením specifity a afinity protilátek k mEng metodou affiblot se provedla optimalizace affiblotu za použití HuEng. Hledalo se optimální pracovní rozmezí koncentrace endoglinu, kdy se vytvořila kalibrační řada čítající koncentrace endoglinu od 0,1 do 20 ng/jamku. Na základě získaných výsledků se zvolilo pracovní rozmezí 0,5-10 ng/jamku. Dále bylo potřeba najít optimální ředění primární protilátky. Testovalo se ředění protilátky v poměrech 1:400, 1:1000, 1:3000 a 1:5000 aplikované na rostoucí koncentraci HuEng. Podle intenzity získaných signálů a s ohledem na spotřebu protilátky se vybralo ředění 1:1000.

Schopnost primárních protilátek detekovat mEng v koncentračním rozmezí 0,5-10 ng/jamku byla testována metodou affiblot. V každém řádku byl prostor pro slepou kontrolu. Protilátka od Thermo Fisher vykazovala oproti WB citlivou detekci mEng, kdy intenzita naměřených signálů rostla úměrně s koncentrací mEng. Protilátka od Abcam, která se ověřila v podmínkách WB, reagovala specificky i v podmínkách affiblotu. I zde rostla intenzita signálů úměrně s koncentrací mEng. Protilátka sc-19793 vykazovala velmi silné signály ve všech pozicích bez ohledu na vzrůstající koncentraci mEng. Silný signál vykazovala opakovaně i v pozici se slepým vzorkem. Vzhledem k tomu, že protilátka v podmínkách WB vykazovala pouze jeden pruh, který se ale nacházel spíše v oblasti pro neredukovaný endoglin, což v našem případě není možné, můžeme říct, že tato protilátka zřejmě s endoglinem nereaguje. Vzhledem k vysokému signálu v pozici se slepým vzorkem se provedl experiment, ve kterém se testovala vazba protilátky na slepé vzorky obsahující BSA o koncentraci 9 μ l. Tímto

experimentem se potvrdilo, že dochází k nespecifické sorpci protilátky na BSA. U poslední testované protilátky sc-18838 byly ve všech pozicích naměřeny jen slabé signály, které nekorespondovaly s koncentračním gradientem mEng, to odpovídá i výsledkům z WB a potvrzuje domněnku, že protilátka neváže endoglin.

Dále se testovala afinita protilátek k mEng metodou affiblot. K tomu se použil mEng o koncentraci 5 ng/jamku. K rozrušení vazby mezi endoglinem a příslušnou protilátkou se použilo chaotropní činidlo thiokyanát amonný o vzrůstající koncentraci v každém sloupci. Intenzita skvrn měla v každém řádku postupně klesat s rostoucí koncentrací thiokyanátu. Takového výsledku bylo dosaženo u protilátky od Thermo Fisher a sc-18838, která ale v předchozích experimentech vykazovala jen slabé signály. Protilátka od Abcam z neznámých důvodu nevydávala žádný signál, a naopak protilátka sc-19793 vykazovala velmi silné signály ve všech pozicích, včetně pozice se slepou kontrolou. I zde se opakoval pokus se vzorky s BSA, kdy chaotropní činidlo nedokázalo rozrušit vazbu mezi BSA a sc-19793.

Ve snaze zjistit, proč slepé kontroly vykazují tak silné signály v kombinaci s sc-19793 byl proveden další experiment, jehož součástí bylo i vyloučit, že je za tyto signály zodpovědná sekundární protilátka anti-kozí IgG/HRP. Zároveň se otestovaly i ostatní sekundární protilátky. Dle výsledku experimentu lze usuzovat, že se sc-19793 skutečně váže na BSA, jehož 5% roztok se používá i k blokaci membrány. Sekundární anti-kozí protilátka IgG/HRP totiž nevykazovala žádné signály v pozicích s endoglinem ani v prázdných pozicích bez antigenu. Tím se prokázalo, že se tato protilátka neváže sama o sobě na endoglin ani na membránu. Kozí anti-králíčí IgG/HRP protilátka nevykazovala žádné signály na rozdíl od anti-myší IgG/HRP, u které byla zaznamenaná mírná nespecifická sorpce u endoglinu i BSA. V přítomnosti primární protilátky se však váže přednostně na cílovou strukturu.

Vazba sc-19793 na BSA se ještě ověřovala pomocí WB. Nespecifická sorpce protilátky na BSA z affiblotu se však nepotvrdila. Příčinou vysokých signálů může být rozdílný postup inkubace a promývání u WB a affiblotu. Její použití tedy zůstává velmi diskutabilní, zejména kvůli výhradní detekci při 130 kDa a žádné při 84 kDa, přičemž v redukujícím prostředí by aspoň větší část endoglinu měla být zredukována. V průběhu měření se zjistilo, že protilátka se přestala vyrábět.

Při výběru nejvhodnější protilátky pro identifikaci endoglinu na WB se jako nejvhodnější jeví protilátka od Abcam. Signál na membráně koresponduje s deklarovanými hodnotami pro redukováný Eng od výrobce. Na affiblotu bylo ověřeno, že protilátka se opravdu specificky váže na Eng a navíc citlivě detekuje rozdíly v koncentraci rekombinantního mEng, což je velmi důležité, pokud mají být detekovány rozdíly v expresi proteinu ve tkáních aorty a jater u zdravých a nemocných jedinců.

5. SEZNAM ZKRATEK

ZKRATKA	VÝZNAM ZKRATKY	ČESKÝ VÝZNAM
ACVRL	<i>Serine/threonine-protein kinase receptor R3</i>	Serin/threonin-protein kinázový receptor R3
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>	Anaplastická lymfomová kináza
ApoE	<i>Apolipoprotein E</i>	Apolipoprotein E
BMP	<i>Bone Morphogenetic Factor</i>	Kosterní morfogenetický faktor
CAD	<i>Coronary Artery Disease</i>	Onemocnění koronárních tepen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	Diferenční skupina
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>	Hepatoceulární karcinom
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>	Virová hepatitida C
HHT	<i>Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia</i>	Hereditární hemoragická telangiektázie
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>	Křenová peroxidáza
HuEndoglin/HuEng	<i>Human Endoglin</i>	Lidský endoglin
Klf6	<i>Krüppel-like factor 6</i>	Krüppelův faktor 6
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i>	Monoklonální protilátka
mEndoglin/mEng	<i>Mouse Endoglin</i>	Myší endoglin
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>	Matricová metaloproteáza
NAFL	<i>Non-alcoholic Fatty Liver</i>	Nealkoholové ztučnění jater
NAFLD	<i>Non-alcoholic Fatty Liver Disease</i>	Nealkoholická tuková jaterní choroba
NASH	<i>Non-Alcoholic SteatoHepatitis</i>	Nealkoholická steatohepatitida
NK	<i>Natural Killers</i>	Přirození zabíječi
pAb	<i>Polyclonal Antibody</i>	Polyklonální protilátka
RGD	<i>Arginyl-Glycyl-Aspartic Acid</i>	Arginyl-glycyl-asparagová kyselina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Reaktivní formy kyslíku
sEng	<i>Soluble Endoglin</i>	Solubilní endoglin
SMAD	<i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog</i>	Matky proti dekapentaplegickým homologům

TB	<i>Transfer Buffer</i>	Pufr pro transfer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>	Tris pufovaný fyziologický roztok
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween</i>	Tris pufovaný fyziologický roztok Tween
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>	Transformující růstový faktor β
WB	<i>Western Blot</i>	Western blot
ZP	<i>Zona Pellucida</i>	Zóna pellucida

6. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Příprava pracovního pufru (PBS)	43
Tabulka č. 2 Příprava promývacího pufru (0,1 % PBST)	43
Tabulka č. 3 Příprava blokačního roztoku (PBST + 5% BSA)	43
Tabulka č. 4 Příprava pufru pro ředění protilátek (0,25% BSA v PBS)	43
Tabulka č. 5 Příprava chaotropního roztoku pro testování afinity	43
Tabulka č. 6 Příprava rozdělovacích gelů 10%	44
Tabulka č. 7 Příprava zaostřovacích gelů 5%	44
Tabulka č. 8 Příprava SDS elektroforetického pufru	44
Tabulka č. 9 Složení nanášecího pufru a funkce jednotlivých složek	44
Tabulka č. 10 Příprava pufru pro transfer	44
Tabulka č. 11 Příprava promývacího roztoku (TBST)	44
Tabulka č. 12 Příprava TBST-5% mléka	44

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Rozvoj aterosklerózy	12
Obrázek č. 2 A Pavučinové metličky; B HHT rtů a brady	13
Obrázek č. 3 Tvar a anatomie jater	14
Obrázek č. 4 Schéma jaterního lalůčku	15
Obrázek č. 5 Porovnání vzhledu a histologického preparátu zdravých jater s NAFL a NASH.....	19
Obrázek č. 6 Progrese onemocnění NAFLD	20
Obrázek č. 7 Struktura endoglinu podle Vicena a kol.	22
Obrázek č. 8 A 3D struktura transmembránového endoglinu; B Nukleotidová sekvence dlouhé izoformy.....	23
Obrázek č. 9 Signalizační dráha dlouhým endoglinem (L-endoglin) a krátkým endoglinem (S-Endoglin).....	25
Obrázek č. 10 Signalizace BMP ligandem	25
Obrázek č. 11 Třídy protilátek	35
Obrázek č. 12 A Fab a Fc části protilátky IgG; B 3D struktura protilátky IgG	35
Obrázek č. 13 A Konstrukce zařízení; B Spodní strana víka; C Horní strana víka s 1 ml rezervoáry; D Umístění antigenu; E Odvod roztoku s reagenciemi pomocí drenážních kanálků do výpusti.....	38
Obrázek č. 14 Schéma stanovení principu afinity	39
Obrázek č. 15 Schéma průběhu WB	39
Obrázek č. 16 Aplikace vzorků tkání, markeru a vody do gelu pro WB při detekci myšního endoglinu (mEng).....	48
Obrázek č. 17 A Schéma nanesení endoglinu (ng/jamku) na membránu; B PVDF membrána vyfocená na Imagelabu; C Sedmibodová kalibrační křivka s použitím lidského endoglinu.....	51
Obrázek č. 18 A Schéma nanesení jednotlivých koncentrací sEng (ng/jamku) a aplikace primární protilátky o různých poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány z porovnání intenzit primár. Protilátek; C Grafické znázornění porovnání intenzit signálu protilátky anti-Eng (P4A4)	52
Obrázek č. 19 A Výsledek membrány s kontrolním proteinem Gapdh; B Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od ThermoFisher; C Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Abcam; D Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Santa Cruz Biotechnology (sc-19793); E Výsledek membrány s mEng a primární protilátkou od Santa Cruz Biotechnology (sc-18838).....	56
Obrázek č. 20 A Znázornění aplikace mEng (ng/jamku) a použitých protilátek v jejich poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány po chemiluminiscenční detekci; C Grafické znázornění stoupajících intenzit signálů primárních protilátek	58
Obrázek č. 21 A Znázornění aplikace mEng (ng/jamku) a použitých protilátek v jejich poměrech ředění; B Fotka PVDF membrány po testování intenzit signálů primár. protilátek.....	60
Obrázek č. 22 A Schéma napipetovaného endoglinu a použitých protilátek při testování afinity k mEng; B Aplikace NH ₄ SCN na PVDF membránu při testu afinity k mEng; C PVDF membrána po stanovení afinity protilátek (mEng)	61
Obrázek č. 23 Postupný pokles afinity primárních protilátek k sEng po aplikaci NH ₄ SCN s rostoucí koncentrací při použití mEng.....	62
Obrázek č. 24 Výsledek intenzity vazby sc-19793 na mEng a BSA	63

Obrázek č. 25 A Aplikace BSA ($\mu\text{g}/\text{jamka}$) a mEng (ng/jamka) při testování primární protilátky od Santa Cruz a sekundární anti-goat protilátky; B Výsledek reakce mEng a BSA s primární protilátkou od Santa Cruz a se sekundárními protilátkami	64
Obrázek č. 26 Aplikace vzorků tkání, markeru, BSA a mEng do gelu pro WB při detekci BSA primární protilátkou s kat. č. 19793	65
Obrázek č. 27 Výsledek membrány s mEng, BSA a primární protilátka od Santa Cruz Biotechnology (sc-19793).....	66

8. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) DOLEZALOVA, E., IGREJA SA, I. C., PRASNICKA, A., et al. High soluble endoglin levels regulate cholesterol homeostasis and bile acids turnover in the liver of transgenic mice. *Life Sciences* [online]. 2019, **232**(1), 116643 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116643>
- 2) IGREJA SÁ, I. C., TRIPSKÁ, K., HROCH, M. 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* [online]. 2020, **21**(23), 9021 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21239021>
- 3) JENG, K.S., SHEEN, I.S., LIN, S.S., LEU, C.M. a CHANG, C.F. The Role of Endoglin in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* [online]. 2021, **22**(6), 3208 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22063208>
- 4) KASPRZAK, A. a ADAMEK, A. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis—A protective factor against liver fibrosis. *Int J Mol Sci* [online]. 2018, **19**(12), 3887 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19123887>
- 5) LEITE, A.R., BORGES-CANHA, M., CARDOSO, R., NEVES, J.S., CASTRO-FERREIRA, R. a LEITE-MOREIRA, A. Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. *Angiology* [online]. 2020, **71**(5) [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0003319720903586>
- 6) MEURER, S. K. a R. WEISKIRCHEN, R. Endoglin: An ‘Accessory’ Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(23), 9247 [cit. 2022-07-19]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21239247>
- 7) SCHOONDERWOERD, J. A., M., GOUMANS, T. H., M-J. a HAWINKELS, J. A. C., L. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* [online]. 2020, **12**. 2. 2020, **10**(2) [cit. 2022-02-06]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/biom10020289>

- 8) Shyu, K.G. The Role of Endoglin in Myocardial Fibrosis. *Acta Cardiol Sin.* 2017;33(5):461-467. [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: [doi:10.6515/acs20170221b](https://doi.org/10.6515/acs20170221b)
- 9) Vicen, M., Igreja Sá, I.C., Tripská, K. et al. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 2405–2418 (2021). [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03701-w>
- 10) ALSAMMAN, M., STERZER, V., MEURER, S. K. et al. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis—A protective factor against liver fibrosis. *Liver International* [online]. 2018, **38**(5), 858-867 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1111/liv.13595>
- 11) UNIPROT CONSORTIUM. UniProtKB - P17813 (EGLN_HUMAN). UniProt [online]. [cit. 2022-02-06]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P17813#structure>
- 12) FLORA, G.D. a NAYAK, M.K. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2019, **25**(38), 4063 - 4084 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/article/101019>
- 13) KATTOOR, A.J., POTHINENI, N.V.K., PALAGIRI, D. a MEHTA, J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* [online]. 2017, **19**(11), 42 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- 14) KOBIYAMA, K. a LEY, K. Atherosclerosis: A Chronic Inflammatory Disease With an Autoimmune Component. *Circulation Research* [online]. 2018, **123**(10), 1118-1120 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816>
- 15) BÁRTOVÁ, J. *Přehled patologie*. Praha: Karolinum, 2021. ISBN 978-80-246-4775-3
- 16) TÁBORSKÝ, M., KAUTZNER, J., LINHART, A. et al. *Kardiologie*. Praha 4: Mladá fronta, 2017. ISBN 978-80-204-4434-9
- 17) VOJÁČEK, J., KETTNER, J. a kol. *Klinická kardiologie*. 3. vydání. Praha 4: Maxdorf, 2017. ISBN 978-80-7345-549-1.

- 18) LIBBY, P., BURING, J.E., BADIMON, L., HANSSON, G.K. et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* [online]. 2019, **5**(1), 56 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
- 19) GEOVANINI, G.R. a LIBBY, P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond)* [online]. 2018, **132**(12), 1243–1252 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1042/CS20180306>
- 20) SUGDEN, W. W. a SIEKMANN, A. F. Endothelial cell biology of Endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Current Opinion in Hematology* [online]. 2018, **25**(3), 237-244 [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000419>
- 21) FLORIAN, R., DESROCHES-CASTAN, A., BAILLY, S. et al. Future treatments for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis* [online]. 2020, **15**(4) [cit. 2022-02-19]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1281-4>
- 22) MCDONALD, J. a STEVENSON, A. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *GeneReviews*® [online]. Seattle (WA): University of Washington, 24. 11. 2021 [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1351/>
- 23) VILÍMOVSKÝ, M. Teleangiektázie: Co jsou teleangiektázie, jaké jsou jejich příčiny, příznaky a možnosti léčby?. *MEDLICKER* [online]. 2019, 17. 9. 2019 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/1667-teleangiektazie>
- 24) OAKLEY, A. Telangiectasia. *Derm Net NZ* [online]. Hamilton, New Zealand, 2014 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://dermnetnz.org/topics/telangiectasia>
- 25) HEALTH JADE TEAM. Falciform ligament. *Health Jade* [online]. [cit. 2022-02-24]. Dostupné z: <https://healthjade.net/falciform-ligament/>
- 26) HŮLEK, P., URBÁNEK, P. a kol. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha 7: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0394-2.
- 27) MESCHER, A. L. *Junqueirovy základy histologie*. Praha 5: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-324-1
- 28) NAŇKA, O. a ELIŠKOVÁ, M. *Přehled anatomie*. 4. vydání. Praha 5: Galén, 2019. ISBN 978-80-7492-450-7

- 29) MCCRACKEN, E., MONAGHAN, M. a SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology* [online]. 2018, **36**(1), 14-20 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- 30) GARIANI, K. a JORNAYVAZ, F. R. Pathophysiology of NASH in endocrine diseases: in Endocrine Connections. *Endocrine Connections* [online]. 2021, **10**(2), 52–65 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1530/EC-20-0490>
- 31) SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports* [online]. 2018, **20**(12) [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- 32) ŠPIČÁK, J. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II*. Praha 7: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0318-8
- 33) MANNE, V., HANDA, P. a KOWDLEY, K. V. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* [online]. 2018, **22**(1), 23-37 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.007>
- 34) SWARUP, S., GOYAL, A., GRIGOROVA, Y. et al. Metabolic Syndrome. *StatPearls Publishing* [internet]. 2021 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459248/>
- 35) OPAZO-RÍOS, L., MAS, S., MARÍN-ROYO, G., MEZZANO, S., GÓMEZ-GUERRERO, C., ANTONIO MORENO, J. a EGIDO, J. Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci* [online]. 2020, **21**(7), 2632 [cit. 2022-03-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21072632>
- 36) COTTER, T. G. a RINELLA, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology* [online]. 2020, **158**(7), 1851-1864 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>
- 37) HEALTH JADE TEAM. What is a fatty liver disease ?. *Health Jade* [online]. [cit. 2022-02-24]. Dostupné z: <https://healthjade.net/fatty-liver-disease/>
- 38) MARTÍNEK, J., TRUNEČKA, P. a kol. *Gastroenterologie a hepatologie v algoritmech*. Praha 4: Maxdorf, 2021. ISBN 978-80-7345-684-9

- 39) TESFAY, M., GOLDKAMP, W. J. a NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. NASH: The Emerging Most Common Form of Chronic Liver Disease. *Missouri medicine* [online]. 2018, **115**(3), 225–229 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140162/>
- 40) PAFILI, K. a M. RODEN. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Molecular Metabolism* [online]. 2021, **50** [cit. 2022-08-17]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>
- 41) DREW, L. Fighting the fatty liver. *Nature* [online]. 2017, **550**, S102-S103 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/550S102a>
- 42) FRAŇKOVÁ, S. a ŠPERL, J. Rizikové faktory a surveillance hepatocelulárního karcinomu. *Vnitřní lékařství* [online]. 2019, **65**(9), 583-587 [cit. 2022-02-24]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2019-9-1/rizikove-faktory-a-surveillance-hepatocelularniho-karcinomu-115580>
- 43) MCGLYNN, K. A., PETRICK, J. L., a EL-SERAG, H. B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* [online]. 2020, **73**(1), 4-13 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/hep.31288>
- 44) HARTKE, J., JOHNSON, M. a GHABRIL, M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Diagnostic Pathology* [online]. 2017, **34**(2), 153-159 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2016.12.011>
- 45) KULIK, L. a EL-SERAG, H. B. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [online]. 2019, **156**(2), 477-491 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>
- 46) NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Endoglin [Homo sapiens]. NCBI [online]. [cit. 2022-02-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC63386.1?report=fasta>
- 47) DERYNCK, R., ZHANG, Y. a FENG, X-H. Transcriptional Activators of TGF- β Responses: Smads. *Cell* [online]. 1998, 11. 12. 1998, **99**(6), 737-740 [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81696-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81696-7)

- 48) BI, J. a GE, S. Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(11), 20656-20667 [cit. 2022-08-19]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms151120656>
- 49) KAPINGIDZA, A. B., KOWAL, K. a CHRUSZCZ, M. Antigen–Antibody Complexes. *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. Subcellular Biochemistry* [online]. 2020, **94**, 465–497 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19
- 50) GOULET, D. R. a ATKINS, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences* [online]. 2020, **109**(1), 74-103 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
- 51) JÍLEK, P. *Imunologie stručně, jasně, přehledně. 2.*, doplněné vydání. Praha 7: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-0595-3
- 52) CHIU, M. L., GOULET, D. R., TEPLYAKOV, A. a GILLILAND, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* [online]. 2019, **8**(4), 55 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- 53) TAO, X., WANG, X., LIU, B. a LIU, J. Conjugation of antibodies and aptamers on nanozymes for developing biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, **168**, 112537 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112537>
- 54) ASCOLI, C. A. a AGGELER, B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques* [online]. 2018, **65**(3), 127-136 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
- 55) HAMMERBECK, C., GOETZ, C., a BONNEVIER, J. Primary and Secondary Antibodies and Flow Cytometry Controls. *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert In: Flow Cytometry Basics for the Non-Expert. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert* [online]. 2018, 75-102 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-98071-3_6

- 56) KARU, A. E., BELL, C. W. a CHIN, T. E. Recombinant Antibody Technology. *ILAR Journal* [online]. 1995, **37**(3), 132-141 [cit. 2022-08-19]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.37.3.132>
- 57) Recombinant Antibodies (rAb). In: *Enzo Life Sciences Inc* [online]. 2018 [cit. 2022-08-16]. Dostupné z: https://www.protilatky.cz/media/pdf/Recombin_Ab_QF.pdf
- 58) THE PROTEIN MAN. Recombinant Antibodies: An Overview. In: *G-Biosciences* [online]. 2015 [cit. 2022-08-19]. Dostupné z: <https://info.gbiosciences.com/blog/recombinant-antibodies-an-overview>
- 59) CITARTAN, M. Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. *Talanta* [online]. 2021, (232) [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122436>
- 60) SVOBODOVA, Z., NOVOTNY, J., OSPALKOVA, B., SLOVAKOVA, M., BILKOVA, Z., FORET, F. Affiblot: a dot blot-based screening device for selection of reliable antibodies. *Analytical Methods* [online]. 2021, **35**(13), 3874-3884 [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1039/D1AY00955A>
- 61) MISHRA, M., TIWARI, S., GOMES, A. V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics* [online]. 2017, **14**(11), 1037-1053 [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- 62) HOSSEIN MEFTAHI, G., BAHARI, Z., MAHMOUDABADI, A. Z., IMAN, M., JANGRAVI, Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2021, **49**(4), 509-517 [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- 63) PILLAI-KASTOORI, L., SCHUTZ-GESCHWENDE, A. R., HARFORD, J. A. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, (593) [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608>

64) BIORADIATIONS STAFF. ChemiDoc™ MP Imaging System. *Bioradiations: A Resource for Life Science Research* [online]. USA, California, 2011, 5. 10. 2011 [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://www.bioradiations.com/chemidoc-mp-imaging-system/>

65) BIORADIATIONS STAFF. ChemiDoc XRS+ System. BIO-RAD [online]. USA, California, 2021 [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4#fragment-2>