

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Histologická analýza vybraných markerů u kardiometabolických onemocnění 2

Lucie Zemánková

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Barbora Vitverová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí práce PharmDr. Barboře Vitverové, Ph.D. za vedení práce a veškeré věcné rady a připomínky. Chtěla bych také poděkovat za pomoc při praktické části bakalářské práce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. a paní laborantce Pavlíně Lukešové.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 12.5. 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lenka Hovén". The signature is written in a cursive, flowing style.

1 Obsah

1	Obsah	1
2	Abstrakt.....	3
3	Abstract.....	4
4	Úvod	5
5	Zadání – cíl práce	6
6	Teoretická část	7
6.1	Morfologické poznámky.....	7
6.1.1	Obecná morfologie jater.....	7
6.1.2	Krevní zásobení	8
6.1.3	Biliární systém	9
6.1.4	Funkční morfologie jater	9
6.1.4.1	Parenchymové buňky	9
6.1.4.2	Neparenchymové buňky	11
6.2	Nealkoholová tuková choroba jater	12
6.2.1	Epidemiologie	12
6.2.2	Etiopatogeneze NAFLD	13
6.2.3	Nealkoholová steatóza.....	15
6.2.4	Nealkoholová steatohepatitida	15
6.2.5	Fibróza jater.....	16
6.2.5.1	Patogeneze fibrózy.....	16
6.3	Myší model pro NAFLD	17
6.3.1	Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD).....	18
6.3.1.1	Myší model C57BL/6	19
6.4	Imunohistochemie	19
6.4.1	Protilátky	20
6.4.2	Vazba antigen – protilátka	20

6.4.3	Odběr materiálu	21
6.4.4	Příprava materiálu	21
6.4.5	Přímá imunohistochemie	21
6.4.6	Nepřímá metoda	22
6.4.6.1	Nepřímá dvojstupňová metoda	22
6.4.6.2	Nepřímá trojstupňová metoda	23
6.5	Markery fibrózy	24
6.5.1	Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA).....	24
6.5.2	Galektin 3.....	25
6.5.3	Kolagenní vlákna	25
7	Praktická část	27
7.1	Laboratorní zvířata	27
7.2	Metodická část	27
7.2.1	Imunohistochemické barvení	27
7.2.1.1	Příprava pro imunohistochemické barvení.....	27
7.2.1.2	Imunohistochemické barvení α -SMA a galektinu 3.....	28
7.2.1.3	Barvení kolagenních vláken.....	30
7.2.1.4	Mikroskopování.....	33
8	Výsledky	34
8.1	Detekce α -SMA v játrech	34
8.2	Detekce galektinu 3 v játrech	36
8.3	Detekce kolagenu v játrech	39
9	Diskuze	42
10	Závěr	45
11	Seznam obrázků.....	46
12	Seznam tabulek.....	46
13	Použité zdroje.....	47

2 Abstrakt

Nealkoholové ztučnění jater (NAFLD) je chronické onemocnění jaterní tkáně. Pokročilejší stádia NAFLD jsou charakterizována rozvojem fibrózy. Fibrotický proces se vyskytuje ve stádiu nealkoholové steatohepatitidy a bývá doprovázen zánětem.

Cílem této studie bylo analyzovat expresi markerů fibrózy (α -SMA, galektinu-3 a kolagenu). V rámci designu studie byly myši rozděleny do dvou skupin, a to kontrolní skupinu, která byla krmena standardní laboratorní dietou (chow diet) a experimentální skupinu krmenu CDAA dietou. CDAA dieta vede k rozvoji fibrózy prostřednictvím inhibice oxidace mastných kyselin v hepatocytech, zvýšením syntézy lipidů a rozvojem oxidačního stresu a zánětu. Myši byly krmeny po dobu 4 týdnů. Expresie vybraných markerů fibrózy byla detekována a hodnocena pomocí nepřímé imunohistochemie metodou ABC.

Výsledky této bakalářské práce ukazují, že pozitivita α -SMA markeru byla u experimentálního modelu silnější a byla zjištěna i v aktivovaných jaterních hvězdicových buňkách a myofibroblastech v játrech. Barvení galektinem-3 bylo také u experimentální skupiny výraznější než u kontrolní skupiny. Sirius Red barvení pro detekci kolagenních vláken prokázalo intenzivnější reakci u experimentální skupiny, kde analýza potvrdila přítomnost kolagenu i mimo hladké svalové buňky cév. Všechny tyto aspekty naznačují probíhající fibrotický a zánětlivý proces po podávání CDAA diety. Závěrem lze říci, že markery fibrózy byly zvýšeny u experimentální CDAA skupiny.

Klíčová slova: játra, imunohistochemie, NAFLD, fibróza, α -SMA, galektin 3, kolagen

3 Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic disease of the liver tissue. More advanced stages of NAFLD are characterized by the development of fibrosis. The fibrotic process occurs at the stage of nonalcoholic steatohepatitis and is usually accompanied by inflammation.

The aim of this study was to analyze the expression of fibrosis markers (α - SMA, galectin - 3 and collagen). As part of the study design, mice were divided into two groups, namely a control group fed a standard laboratory diet (chow diet) and an experimental group fed a CDAA diet. CDAA diet leads to the development of fibrosis through inhibition of fatty acid oxidation in hepatocytes, increase in lipid synthesis and development of oxidative stress and inflammation. Mice were fed for 4 weeks. The expression of selected fibrosis markers was detected and evaluated by indirect immunohistochemistry using the ABC method.

The results of this thesis show that α -SMA marker positivity was stronger in the experimental model and was also detected in activated hepatic stellate cells and myofibroblasts in the liver. Galectin-3 staining was also more pronounced in the experimental group than in the control group. Sirius Red staining for the detection of collagen fibers was also more intense in the experimental group, where the analysis showed the presence of collagen outside the smooth muscle cells of blood vessels. All of these aspects suggest an ongoing fibrotic and inflammatory process after administration of the CDAA diet. In conclusion, fibrosis markers were increased in the experimental CDAA group.

Keywords: liver, immunohistochemistry, NAFLD, fibrosis, α -SMA, galectin 3, collagen

4 Úvod

Fibróza se vyskytuje v progresivním stádiu NAFLD zvaném nealkoholová steatohepatitida. Fibrotický proces je reakcí na hojení ran při chronickém poškození jater. V případě, kdy dojde k trvalému poškození jaterního parenchymu v důsledku chronického onemocnění jater, jaterní parenchym je nahrazen fibrotickou tkání. Neléčená fibróza může vést až k cirhóze (Maurice & Manousou, 2018).

U jaterní fibrózy dochází k několikanásobnému zvýšení celkového obsahu extracelulární matrix. Fibróza je výsledkem převažující fibrogenese nad fibrolýzou. Stupeň či stádium fibrotického procesu je hlavním ukazatelem v hodnocení závažnosti onemocnění nealkoholového ztučnění jater. Za hlavní zdroj jaterních fibrogenních buněk jsou považovány hvězdicové buňky. Aktivované hvězdicové buňky se diferencují na myofibroblasty, a ty hrají ústřední roli během jaterní fibrózy (Acharya et al., 2021).

Pro hodnocení rozvoje fibrózy bylo využito zobrazení markerů pomocí imunohistochemické analýzy. Specificky byly vybrány tři markery, které reflektují rozvoj fibrózy, a to α -SMA, galektin 3 a detekce kolagenních vláken. α -SMA se fyziologicky nachází v hladkých svalových buňkách v cévní stěně. Používá se jako marker pro podskupinu aktivovaných fibrogenních buněk v hojících se tkáních. α -SMA je specificky exprimována myofibroblasty. Pomocí α -SMA detekujeme aktivované hvězdicové buňky (Shen Cherng et al., 2008). Galektin 3 ovlivňuje funkci makrofágů a přispívá k profibrotickému makrofágovému fenotypu vazbou na transmembránový receptor CD98. Předpokládá se, že zvýšená exprese galektinu 3 v chronicky zanícených tkáních aktivuje myofibroblasty, což vede k tvorbě jizev (Slack et al., 2021). Průkazu kolagenních vláken se využívá hojně k diagnostice nadměrného ukládání vaziva. Jedná se o biomolekulu produkovanou fibroblasty. Fibróza je charakterizována zejména nadměrnou akumulací proteinů a enzymů extracelulární matrix, hlavně fibrilárních kolagenů. Fibroblasty jsou stimulovány k tvorbě vláken kolagenu (Hall et al., 2021). Na základě výše uvedených dat byly tyto tři markery (α -SMA, galektin 3 a kolagen) vybrány pro zhodnocení rozvoje fibrotického procesu.

5 Zadání – cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo popsat anatomii jater, uvedení do problematiky nealkoholového ztučnění jater (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) a shrnutí metody imunohistochemie používanou k diagnostice markerů fibrózy. Dalším cílem byla samotná imunohistochemická analýza vybraných markerů fibrózy, a to α SMA, kolagenních vláken a galektinu 3 na řezech myších jater, u kterých byla dietou indukována NAFLD.

6 Teoretická část

6.1 Morfologické poznámky

6.1.1 Obecná morfologie jater

Játra (hepar) jsou největší exokrinní žlázou lidského těla a označujeme je za hlavní orgán látkové výměny. Hrají hlavní roli v metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin. Hmotnost jater se pohybuje od 1 kg do 2,5 kg. Játra mají hnědočervenou barvu, jsou měkká a poddajná, ale také velmi křehká, a proto dochází snadno k natržení tkáně (Čihák Radomír, 2013). Játra mají klínovitý tvar a jsou uložena v pravé brániční klenbě. Rozeznáváme dvě části jater. A to, část jater *facies diaphragmatica*, která je přiložená k bránici a dolní část *facies visceralis*, která je obrácená k břišním orgánům. Diafragmatickou plochu od viscerální odděluje část zvaná *margo inferior*. *Margo inferior* odděluje plochy vpravo a vpředu, v zadní části plochy přecházejí zaobleně (Dylevský Ivan, 2009).

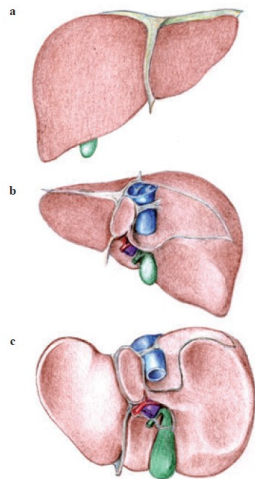
Celá játra kryje peritoneální povlak, který se nazývá *tunica serosa*. Z tohoto povlaku vznikají rýhy a přechází na závěsy jater *ligamentum falciforme hepatis*, *ligamentum teres hepatis* a *ligamentum coronarium hepatis*. V zadní části jsou játra spojena s bránicí částí *area nuda*. *Area nuda* není kryta *tunicou serosou*. *Tunica serosa* je připevněna *telou subserosou* k *tunica fibrosa*. *Tunica fibrosa* je pevný vazivový povlak jater (Čihák Radomír, 2013; Ehrmann Jiří, 2014).

Úzký pruh na játrech *ligamentum falciforme* (srpkovitý vaz) spojuje játra s bránicí a rozděluje povrch jater na dva hlavní anatomické laloky. Na pravý lalok (*lobus dexter*) a levý lalok (*lobus sinister*), který je menší než pravý lalok. Kromě dvou velkých laloků jsou na pravé straně povrchu jater dva menší laloky *lobus caudatus* a *lobus quadratus* (Dylevský Ivan, 2009). Tyto dva menší laloky se nachází uprostřed mezi *lobus dexter* a *lobus sinister*. Všechny jaterní laloky rozdělují rýhy, které představují písmeno H (Čihák Radomír, 2013). Vzhledem k měkkému a poddajnému charakteru jater se na jejich tvaru podílí i kontakt s okolními orgány. A tak se v játrech značí viditelné otisky *impressio*

oesophagea, impressio gastrica, impressio suprarenalis, impressio renalis, impressio duodenalis a impressio colica (Ehrmann Jiří, 2014).

Játra jsou velmi těžký orgán, a proto jsou fixována několika mechanismy (závěsy, podpora břišních orgánů a srůst s bránicí). Velký fixační význam má také atmosférický tlak, který fixuje játra do brániční klenby (Čihák Radomír, 2013).

Obrázek 1 - zevní pohled jater



Pohled na anatomickou stavbu jater a) přední plocha b) zadní plocha c) dolní viscerální plocha (Ehrmann Jiří, 2014) (převzato).

6.1.2 Krevní zásobení

Játra jsou zásobována krví ze dvou zdrojů. Játra mají funkční a nutritivní krevní zásobení. Funkční zásobení jater zajišťuje portální oběh, 80 % krve je dodáváno portální žilou. *Vena portae* (vrátnicová žíla) shromažďuje žilní krev z nepárových orgánů trávicího traktu. Krev z nepárových orgánů břišní dutiny je velmi bohatá na živiny. Portální žíla nemá chlopně (Ehrmann Jiří, 2014). Žíla se dělí na dvě větve, pro pravý a levý lalok. Větve pro pravý a levý lalok se dále větví na mezilalúčkové žíly, na které navazují jaterní sinusoidy. Ty pokračují přes *vena centralis, venae hepaticae* až k *vena cava inferior*. *Arteria hepatica communis* (společná jaterní tepna) zajišťuje nutritivní oběh jater, přivádí totiž do jater okysličenou krev. Přímo do jater vstupuje *arteria hepatica propria*, jedná se o větev *arteria hepatica communis*. *Arteria hepatica propria* vstupuje do hilu jater uvnitř *ligamentum hepatoduodenale* v blízkosti *ductus hepaticus communis* (Dylevský Ivan, 2009).

Jaterní sinusoidy jsou žilní útvary charakteru kapilár a mají nepravidelné rozšíření. Stěna je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které mají fenestrace. Za minutu proteče játry asi 1,5 litru krve (Dylevský Ivan, 2009).

6.1.3 Biliární systém

V játrech je tvořena žluč, žlutá tekutina, která se účastní trávicích procesů. Žluč je produkována jaterními buňkami a dále se upravuje ve žlučových cestách, které začínají uvnitř jaterního lalůčku. Žlučové cesty představují utěsněný kapilární prostor. Žluč je secernována na hepatocytu. Pro tvorbu žluči jsou potřebné látky transportovány přes membránu do kapiláry uvnitř jaterní buňky. Lalůček žluč opouští Herringovým kanálkem a následně putuje do portobiliárního prostoru, kde se napojuje na interlobulární žlučovod (*ductus bilifer interlobularis*). Větve *ductus bilifer interlobularis* se napojuje do *ductus hepaticus dexter a sinister*, které odvádí žluč z jater (Čihák Radomír, 2013; Ehrmann Jiří, 2014).

6.1.4 Funkční morfologie jater

Játra se skládají z několika typů buněk různého embryologického původu. V játrech rozeznáváme buňky parenchymového a neparenchymového původu. Každá z buněk má jedinečné funkce, které kooperativně regulují funkci jater na několika úrovních. Buňky parenchymu nazýváme hepatocyty. Kupfferovy buňky, endotelové buňky, epitelové buňky žlučových cest (cholangiocyty), Itovy buňky (hvězdicové buňky) a pit buňky jsou neparenchymové buňky. Hepatocyty jsou primární epitelální buněčná populace jater (Ehrmann Jiří, 2014; Trefts et al., 2017). Tvoří většinu objemu jater (asi 60–80 %) a vykonávají mnoho funkcí připisovaných játrům. Neparenchymové buňky zabírají asi 20–40 %. Z toho nejvíc zastoupené jsou cholangiocyty epitelální populace jaterních buněk. Nejméně jsou zastoupené Itovy buňky (Ehrmann Jiří, 2014).

6.1.4.1 Parenchymové buňky

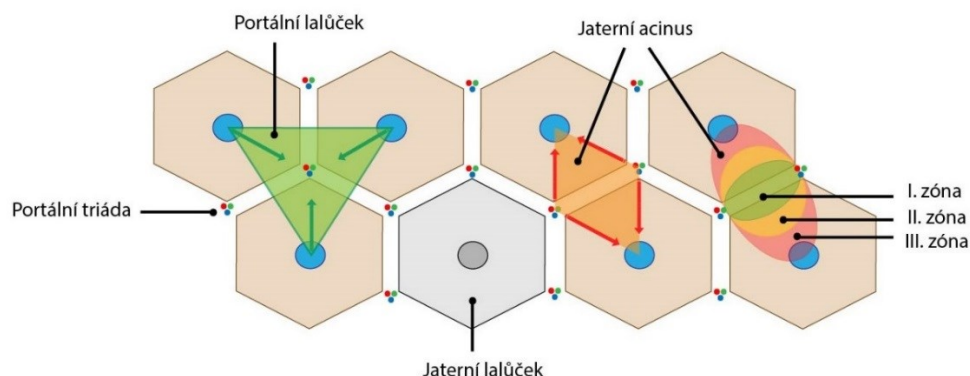
Hepatocyty představují dvě třetiny jater (Ehrmann Jiří, 2014). Jedná se o polyedrické buňky, které mají mnoho mikroklyků. Mikroklyky zvětšují povrch a zvyšují absorpční schopnost buněk. Hepatocyty jsou poměrně dlouho žijící buňky, jelikož se obnovují přibližně každých 5 měsíců. To se může měnit při

regeneračních procesech, kdy hepatocyty vykazují vysokou schopnost proliferace a regenerace poškozené jaterní tkáně. Jsou to buňky o průměru asi 20 až 30 μm . Obvykle mají kulaté jádro se středem v cytoplazmě, u dospělých lidí však může být až 25 % hepatocytů dvoujaderných (Atlas of plant and animal histology, b.r.). Radiálně uspořádané hepatocyty vytvářejí 1 až 2 vrstvy a tvoří útvar *lobus venae centralis* (lalůček centrální žíly) neboli jaterní lalůček. Dvě přiložené řady hepatocytů tvoří trámce. Strukturu jater popisujeme třemi jednotkami. *Lobus venae centralis* je hlavní morfologická jednotka jater, připomínající tvarem mnohoúhelník hexagon. Vrstvy hepatocytů směřují do centra lobu. *Vena centralis* se nachází uprostřed laloku v centru lobu. Prostor mezi hepatocyty vyplňují drobné cévky, zvané jaterní sinusoidy (Dylevský Ivan, 2009). Portální lalůček (lalůček vratnicové žíly), je považován za funkční jednotku jater. Vrcholy portálního lalůčku jsou ve třech venae centrales. Ve středu se nachází portální triáda. Portální lalůček je útvar orientovaný kolem portální triády. Základní funkční jednotkou jater je jaterní acinus, což je nejmenší funkční jednotka jater. Na řezu má tvar dvou trojúhelníků. Acinus nejlépe odráží vztah mezi krevní perfúzí, metabolickou aktivitou jater a patologickými procesy. Acinus má osu tvořenou linií mezi dvěma portálními triádami a pak druhou linií mezi dvěma centrálními žíly. Acinus má tři zóny (Ehrmann Jiří, 2014).

- „zóna I – nejbližší přívodným cévám – obsahuje hepatocyty, které přicházejí do styku s krví bohatou na kyslík i živiny, jsou nejodolnější vůči hypoxii
- zóna II – střední – přechodná
- zóna III – nejvzdálenější – hepatocyty se nacházejí v blízkosti centrálních žil, jsou perfundovány krví se sníženou koncentrací kyslíku a živin“ (Ehrmann Jiří, 2014, s 27).

Funkce zón je závislá na jejich zásobování krví. V zóně I je nejvyšší zásobení krví a živinami, probíhá zde beta-oxidace mastných kyselin, glukoneogeneze a glykogenolýza (uvolňování glukózy do krve). Zóna II má nižší zásobení krví a živinami, a jedná se tak o zónu přechodnou. V zóně III je nejnižší zásobení kyslíkem a živinami, a proto zde probíhá syntéza glykogenu, glykolýza a ketogeneze (Ehrmann Jiří, 2014).

Obrázek 2 - Schéma jaterních lalůček a jaterního acinu



Portální triáda je prostor vyplněný vazivovou tkání. Uvnitř prochází interlobulární tepna, interlobulární žíla a interlobulární žlučovod, proto triáda (Funkce buněk lidského těla • Multimediální skripta, b.r.).

6.1.4.2 Neparenchymové buňky

Neparenchymové buňky jsou důležité pro zajištění normálních funkcí jater. V sinusoidě jater sídlí buňky patřící mezi tkáňové makrofágy nazýváme je Kupfferovy buňky. Jedná se o fagocyty a mají bohatě členěný povrch (Čihák Radomír, 2013). Hrají velmi důležitou roli v imunitních reakcích. Funkce Kupfferových buněk je obrana hostitele. Odstraní, pomocí fagocytózy, imunokomplexy, staré erytrocyty, zbytky rozpadlých buněk, cizí, toxické a infekční látky z portální krve (McCuskey & McCuskey, 1990). Kupfferovy buňky také poskytují signální molekuly používané pro komunikaci mezi buňkami (interleukiny – IL-1 a IL-6, tumor nekrotizující faktor a interferony) (Ehrmann Jiří, 2014; Poisson et al., 2017). Mezi neparenchymové buňky zahrnujeme i endotelové buňky, které obsahují mnoho fenestrací. Představují rozhraní mezi krevními buňkami na jedné straně a hepatocyty a jaterními hvězdicovými buňkami na straně druhé. Nemají bazální membránu jako ostatní endotelové buňky, a to z nich dělá nejpropustnější endotelové buňky v těle savců. Vykazují také nejvyšší kapacitu endocytózy z lidských buněk, zachycují makromolekuly a malé částice z krevního řečiště (Poisson et al., 2017). Zajišťují záchyt HDL a LDL. Cholangiocyty, epitelové buňky žlučových cest, mají podíl na úpravě žluči (Ehrmann Jiří, 2014). Jejich fyziologická funkce spočívá v modifikaci jaterní primární žluči při jejím transportu podél žlučového stromu. Modifikace spočívá v koordinovaném transportu různých iontů, rozpuštěných látek a vody

přes apikální a bazolaterální plazmatické membrány cholangiocyty (Tabibian et al., 2013).

Itovy buňky, též hvězdicové buňky nebo stelátní buňky, slouží za normálních podmínek ke skladování retinoidů. Uchovávají vitamín A. Při poškození jater se transformují v buňky podobající se myofibroblastům a tvoří kolagen. Způsobují rozvoj jaterní fibrózy a cirhózy. Pit buňky řadíme mezi natural killers buňky, mají úlohu v ochraně proti virovým infekcím a metastatickým nádorovým buňkám. Mezi neparenchymové buňky též patří i oválné buňky, které se diferencují na hepatocyty či cholangiocyty v případě, kdy jsou poškozeny (Čihák Radomír, 2013; Ehrmann Jiří, 2014).

6.2 Nealkoholová tuková choroba jater

Nealkoholové ztičnění jater (*non alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) je nemoc, při které dochází k hromadění tuku v játrech. Jedná se o makrovezikulární změny bez významného užívání alkoholu. Je to tedy stav, který je charakterizován průkazem jaterní steatózy a nejsou přítomny sekundární příčiny jaterní steatózy (konzumace alkoholu). NAFLD je také považována za jaterní manifestaci metabolického syndromu (Bauer et al., 2022; Pujitha Kudaravalli; Savio John., 2022).

Játra jsou nezbytný orgán v metabolismu lipidů. Jsou zodpovědná za řízení syntézy nových mastných kyselin, jejich export, redistribuci do jiných tkání a za jejich využití jako energetických substrátů. Všechny tyto dráhy jsou velmi regulovány. Porušení i jediné z drah může urychlit retenci tuku v játrech a vést k rozvoji NAFLD. Hromadění tuku v játrech má několik důvodů. Nejčastějším důvodem je zvýšená dodávka volných mastných kyselin do jater, zvýšená syntéza mastných kyselin v játrech nebo snížená syntéza lipoproteinů s velmi nízkou hustotou v játrech (Pujitha Kudaravalli; Savio John., 2022).

6.2.1 Epidemiologie

NAFLD je nyní celosvětově hlavní příčinou chronického onemocnění jater. Výskyt NAFLD velmi rychle roste. V současné době je hlavní příčinou morbidity a mortality související s játry. Předpokládá se, že se do roku 2030 stane také nejčastější indikací transplantace jater (Byrne & Targher, 2015). Nejrychleji roste v západních zemích. Prevalence NAFLD se odhaduje na 20-30

% . Prevalence NAFLD je zpravidla vyšší u mužů a roste s přibývajícím věkem. Studie Dallas Heart Study a Dionysos Study uvádějí, že 30 % dospělých v USA a 25 % v Itálii má NAFLD. NAFLD se více vyskytuje i v dětském věku. Pediatriká NAFLD se v roce 2010 zvýšila přibližně o dvě procenta (Bellentani et al., 2010).

6.2.2 Etiopatogeneze NAFLD

NAFLD zahrnuje jaterní stavy různé závažnosti. NAFLD lze rozdělit na NAFL (nealkoholová ztučnělá játra) a NASH (nealkoholová steatohepatitida). NAFL je nejmírnější formou a NASH je na druhém konci spektra, je velmi závažnou formou nemoci. Stádia nealkoholového ztučnění jater začínají prostou steatózou a progredují v NASH, zánětlivý stav charakterizovaný jaterní fibrózou progredující do cirhózy. NAFLD je často reverzibilní a asymptomatická. Neléčená NAFLD vede k nevratnému poškození jater, které vyžaduje transplantaci jater. NAFLD zvyšuje výskyt rizika hepatocelulárního karcinomu. Nealkoholové ztučnění jater je výrazně ovlivněno malnutricí. K rozvoji přispívají vnější faktory i genetické faktory. Hlavní předpoklady vzniku a rozvoje NAFLD je nepoměr mezi energetickým příjmem (nadměrný kalorický příjem) a výdejem (nízká fyzická aktivita). Tento nepoměr vede k akumulaci tuků v tukové tkáni i jiných orgánech. Akumulací vzniká obezita a rozvíjí se inzulinová rezistence. Příčiny vzniku NAFLD mohou být obezita, inzulinová rezistence, diabetes mellitus, vysoký cholesterol, vysoká hladina triacylglycerolů, vysoký krevní tlak a rychlé hubnutí se špatnou stravou (Bauer et al., 2022; Friedman et al., 2018; Heyens et al., 2021).

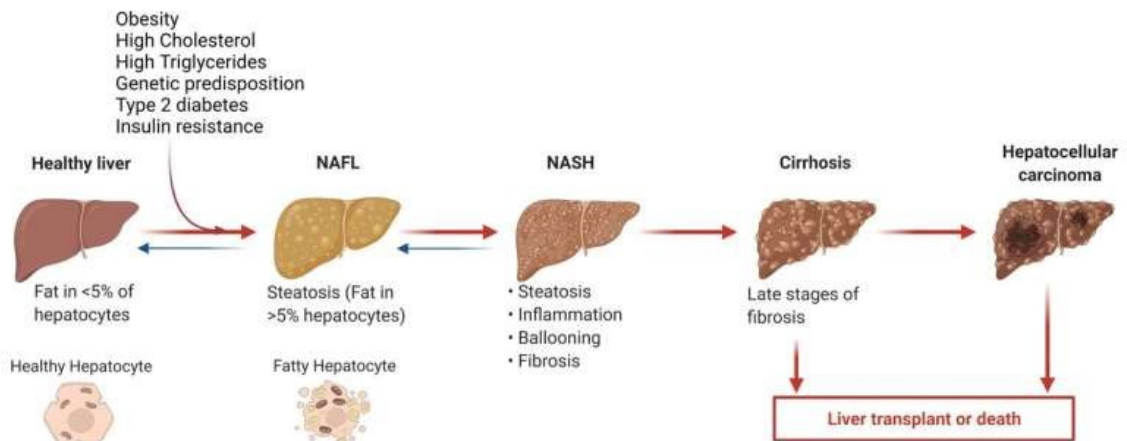
Několik let byla předkládána teorie patogeneze dvou zásahů. Tato teorie naznačovala, že pro rozvoj NASH by musel při NAFL přijít druhý zásah. Steatóza je považována za první zásah. A aby přešla do NASH je zapotřebí druhý zásah, který způsobuje poškození buněk a zánět. Tento názor je v dnešní době považován za zastaralý. A uznává se teorie více zásahů (Friedman et al., 2018).

Metabolický základ patogeneze je nadměrná akumulace volných mastných kyselin (free fatty acid, FFA) v játrech. Jedná se o nerovnováhu mezi zvýšenou dostupností FFA a sníženým odstraňováním FFA mitochondriální

β -oxidací, exportem lipoproteinů o velmi nízké hustotě. Mastné kyseliny se primárně ukládají v tukové tkáni jako triacylglyceroly. U obézních lidí jsou mastné kyseliny nesprávně směřovány do ektopických míst, jako je kosterní a jaterní tkáň (Bauer et al., 2022; Friedman et al., 2018; Polyzos et al., 2016).

Přebytečná energie ze stravy se obvykle ukládá ve formě tuku v zásobnících. Schopnost tukové tkáně (adipocytů) ukládat tuk je dána geneticky. V případě, kdy dojde k překročení kapacity dochází k přetížení a poškození adipocytů. To má za následek inzulinovou rezistenci (IR). IR způsobuje nerovnováhu v homeostáze metabolismu glukózy a lipidů. Do oběhu se dostává více FFA, které musí být zpracovány játry. Důsledkem nerovnováhy jsou sacharidy z potravy absorbovány játry a přeměněny na FFA lipogenezí. Zhruba 40 % tuku, který se hromadí v játrech, pochází ze sacharidů a tuků ve stravě. Zbývající tuk pochází z dysfunkčních adipocytů. IR vede k zvýšení toku FFA, to má za následek toxický účinek na játra. Tento toxický účinek nazýváme lipotoxicita. FFA se za fyziologických podmínek rozkládají v mitochondriích beta-oxidací. V důsledku přetížení FFA jsou mitochondrie zahlceny. To vede k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Friedman et al., 2018; Heyens et al., 2021). Tyto mechanismy vedou k prozánětlivému a apoptotickému klimatu v játrech. Na rozvoji NAFLD se podílejí i imunitní pochody v játrech. Kupfferovy buňky absorbují velké množství FFA, což je vede k zánětlivému fenotypu. Dochází k aktivaci nukleárního faktoru kappa B. Dále se významně zvyšuje produkce prozánětlivých cytokinů nacházejících se v játrech, jako je IL-6, tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a IL-10 (Polyzos et al., 2016).

Obrázek 3 - stádia NAFLD



Na obrázku je progrese onemocnění při ztučnění jater. Obezita a další faktory představují rizikové faktory pro NAFLD. Druhý obrázek jater znázorňuje začínající akumulaci tuku v hepatocytech. Poté následuje NASH. Šipky nám naznačují, že NAFL a NASH jsou v raném stádiu vratné. Poslední dvě stádia (cirhóza a karcinom) jsou nevratné. Východiskem je jediné transplantace jater (Jackson et al., 2022).

6.2.3 Nealkoholová steatóza

Jaterní steatóza je akumulace tuků v jaterních buňkách. Je to první stupeň poškození jater. Tuk se akumuluje v játrech v podobě tukových kapének. Dochází k mírné změně v jaterní tkáni. Jedná se o formu NAFLD bez známek poškození ve formě balonování hepatocytů. Steatóza bývá často odhalena náhodně, jelikož je většinou asymptomatická (Pujitha Kudaravalli; Savio John., 2022). O steatóze hovoříme ve chvíli, kdy jsou tukové inkluze ve více než 5 % hepatocytů při histologickém vyšetření (Brůha, 2019; Heyens et al., 2021).

6.2.4 Nealkoholová steatohepatitida

Nealkoholová steatohepatitida je pokročilá a agresivní forma NAFLD. NASH je definována jako přítomnost jaterní steatózy a zánětu s poškozením hepatocytů (balonování). Jedná se o stav zánětu jater, který vede k transformaci jaterních hvězdicových buněk na myofibroblasty. Tyto buňky produkují extracelulární matrix. A proto je NASH doprovázena fibrózou, která může progredovat do cirhózy (Pujitha Kudaravalli; Savio John., 2022). Na vývoji NASH se podílejí vedlejší produkty nebo meziprodukty metabolismu volných mastných kyselin, jako je oxidační stres, účinky cytokinů či genetická predispozice (Brůha, 2019). Rychlost progrese onemocnění je obvykle

pomalá. Asi u 20 % pacientů s NAFLD se během tří až sedmi let rozvine NASH. U 9 až 25 % jedinců s NASH se během 10 až 20 let rozvine cirhóza (Heyens et al., 2021).

6.2.5 Fibróza jater

Fibrotický proces je to reakcí na hojení ran při chronickém poškození jater. Je charakterizován dysregulací fyziologické remodelace, aktivací myofibroblastů a tvorbou vazivové jizvy (Nouchi et al., 2008). Když dojde k trvalému poškození jaterního parenchymu v důsledku chronického onemocnění jater, jaterní parenchym je nahrazen fibrotickou tkání. Neléčená a progresivní fibróza vede k cirhóze (Maurice & Manousou, 2018). Ve zdravém jaterním parenchymu poskytuje extracelulární matrix podporu ve formě pouzdra. Myofibroblasty vyvíjejí kontraktilní funkce a vylučují proteiny extracelulární matrix, které tvoří vláknitou jizvu. Myofibroblasty nejsou přítomny v normálních játrech, ale aktivují se a prolifерují v reakci na poranění a zánět (Nouchi et al., 2008). Fibróza je výsledkem dynamických a komplexních interakcí mezi fibrogenezí a fibrolýzou. Když fibrogenese dominuje a převyšuje fibrolýzu, dochází k fibróze. Fibróza je hlavním ukazatelem v hodnocení závažnosti onemocnění nealkoholového ztučnění jater. Fibróza postupuje v několika krocích (Venkatesh & Torbenson, 2022).

- krok 1 - portální fibróza (periportální fibróza): ukládání kolagenu, který rozšiřuje portální trakty
- krok 2 - přemostňující fibróza: portoportální a portocentrální fibróza
- krok 3 – cirhóza (Venkatesh & Torbenson, 2022).

6.2.5.1 Patogeneze fibrózy

Všechna hepatocelulární poranění aktivují fibrogenní dráhy. Jakmile jsou tyto dráhy aktivovány, fibrogenní složky extracelulární matrix (ECM) jsou vylučovány, aby zapouzďily a izolovaly poškozenou část tkáně pro opravu. Akumulace mezibuněčné hmoty vzniká důsledkem zvýšené syntézy a snížené degradace. Nefibrogenní kolagen typu IV je v ECM nahrazen fibrogenním kolagenem typu I a III. Dochází k sekreci fibronektinu, kyseliny hyaluronové a α -aktinu hladkého svalstva do ECM. Ztrácejí se fenestrace endotelových

buněk a také mikrokilky na bazální membráně hepatocytů, čímž je ohrožena výměna živin a metabolitů (Acharya et al., 2021; Subramanian et al., 2022).

Za hlavní zdroj jaterních fibrogenních buněk jsou považovány hvězdicové buňky (HSC). Jaterní hvězdicové buňky transdiferencují z klidových HSC na aktivované HSC. Během diferenciacce se charakteristický tvar hvězdy HSC mění na více kapkovou formu (Heyens et al., 2021). Aktivované buňky se diferencují na myofibroblasty, které hrají ústřední roli během jaterní fibrózy. Aktivované hvězdicové buňky produkují nadměrné množství ECM v poraněných játrech (Elpek, 2014; Zhang et al., 2016). Během normální opravy tkáně přispívá přechodná aktivace myofibroblastů k obnově integrity tkáně vytvořením mechanické jizvy, která se obvykle rozpustí, když je tkáň opravena. V této fázi jsou myofibroblasty vyčištěny apoptózou nebo inaktivací. Naproti tomu přetrvávající aktivace myofibroblastů způsobuje akumulaci a kontrakci kolagenní extracelulární matrix (Nouchi et al., 2008). Neparenchymové buňky začnou následně produkovat pro-fibrogenní cytokiny. Vzniká složitá síť cytokiny indukovaných drah pro koordinaci pro-fibrogenních buněčných interakcí (Heyens et al., 2021).

Progrese fibrózy k cirhóze jater vzniká v důsledku těžkého poškození jater, kdy tvrdá vazivová tkáň postupně nahrazuje zdravou jaterní tkáň a zpomaluje tak činnost jater (Cha et al., 2018).

6.3 Myší model pro NAFLD

Zvířecí modely nám poskytují základní informace pro zkoumání patogeneze. Model myši by měl odrážet histopatologii a patofyziologii lidského NAFLD. To znamená, že u modelů NAFLD bychom měly pozorovat steatózu, zánět, hepatocelulární balonování a také fibrózu. Je důležité, aby nemoc byla v modech co nejpodobnější lidskému průběhu, a proto by měly být prokázány metabolické abnormality. Používají se nutriční myší modely a geneticky upravené modely. Souvislost mezi výskytem NAFLD a obezitou vedla k zavedení vysokotukové diety u myších modelů (Asgharpour et al., 2016; Takahashi, 2012).

6.3.1 Dieta s vysokým obsahem tuku (HFD)

U této diety tvoří tuk 45–75 % celkového počtu kalorií. Tato dieta je tvořena mastnými kyselinami, polynasyčenými mastnými kyselinami a různou kombinací těchto kyselin. Nadměrný přísun těchto kyselin způsobuje akumulaci triacylglycerolů v játrech. HFD přináší fenotyp podobný lidskému onemocnění, charakterizovaný obezitou, inzulinovou rezistencí a hyperlipidemií. Doba nástupu a stupeň NAFLD závisí na druhu a pohlaví modelu a také na obsahu tuku ve stravě. U diety s vysokým obsahem tuku se liší výsledky i v typu použitého tuku (Flessa et al., 2022). U potkanů krmených HF dietou se rozvinula výrazná steatóza a koncentrace lipidů v játrech těchto potkanů byly přibližně dvakrát vyšší než u kontrolních potkanů krmených standardní dietou Lieber-DeCarli (35 % tuku, 47 % sacharidů a 18 % bílkovin). Když byla dieta omezena, došlo ke snížení steatózy a zánětu v játrech, oxidačního stresu a hladiny inzulínu v plazmě (Takahashi, 2012). Do vysokotukové diety se mohou přidávat další přísady. HFD bez přísad vyvolává mírnou steatohepatitidu a málo rozšířenou fibrózu. Ovšem u této diety je pozorován nárůst počtu tukových buněk v porovnání s ostatními dietami (Flessa et al., 2022).

Snížená citlivost na inzulín se obvykle objeví za čtyři týdny (Van Herck et al., 2017). Steatóza a zánět bývají u HFD za stejnou dobu diety u myších modelů méně výrazné než u diety s nedostatkem methioninu a cholinu. Deficit obou živin má za následek zhoršenou β -oxidaci lipoproteinů. Deficit cholinu zhoršuje jaterní sekreci VLDL, což má za následek hromadění tuku v játrech a smrt jaterních buněk (Ibrahim et al., 2016). Dieta s nedostatkem methioninu a cholinu (MCD) obsahuje sacharózu a střední obsah tuku (10–40 %). Tato dieta velmi rychle vyvolává znaky NAFLD, ale liší se průběh od metabolického průběhu u lidí, a to v důsledku úbytku hmotnosti, proto není tato dieta optimální pro vyšetření parametrů NAFLD (Van Herck et al., 2017). Obměnou MCD je polosyntetická cholin-deficientní L-aminokyselinová dieta (CDAA). Tato dieta má také deficit cholinu a dietní proteiny jsou nahrazeny směsí L-aminokyselin. Při této dietě myši nezaznamenají ztrátu hmotnosti pozorovanou při dietě MCD. Dieta se může používat v kombinaci s HFD. V mé práci byla právě použita kombinace HFD s CDAA. Kombinace HFD s CDAA (CDAA-HFD) má za

následek obezity, NASH, fibrózu a progresi do hepatocelulárního karcinomu (Nahon et al., 2020).

V praxi se používá několik variací diety s vysokým obsahem tuku. Fruktóza má zhoršující účinky na metabolismus lipidů. Proto se využívá kombinované použití HFD s fruktózou. Fruktóza podporuje lipogenezi v játrech, inhibuje β -oxidaci a indukuje jaterní inzulín, a to napomáhá rychlé akumulaci lipidů. Další variací HFD je přidání cholesterolu do stravy (Jiang et al., 2019).

6.3.1.1 Myší model C57BL/6

C57BL/6 myší model je nejrozšířenějším používaným kmenem v biomedicině. Tento model byl vyvinut americkým genetikem C.C. Littlem v roce 1921. Často je tento kmen uváděn pod názvem B6. Byl vyvinut v Jacksonově laboratoři ve Spojených státech amerických. Je využíván jako inbrední kmen. Kmen C57BL/6 byl rozdělen na dva podkmény, a to na Jackson Laboratory - C57BL/6J podkmen a National Institutes of Health – C57BL/6N podkmen. U kmene C57BL/6 je velmi vysoká aktivita NK buněk, protože kmen byl v první řadě vyvinut pro studium protinádorové a imunologické odpovědi (Song & Hwang, 2017). C57BL/6J myší model vykazuje nízkou hustotu kostí a je odolný vůči audiogenním epileptickým záchvatům. Je velmi náchylný k obezitě vyvolané dietou. Jedná se o víceúčelové modely, které jsou ideální pro dietou indukovanou obezitu, vývoj transgenního modelu a imunologii. Pouze laboratoře Jackson Laboratory a Charles River v Evropě a Japonsku udržují kolonie C57BL/6J, které pocházejí z čistokrevných myší z The Jackson Laboratory (web Animalab, b.r.).

6.4 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) se používá k detekci antigenů v řezech tkáních. IHC zobrazuje konkrétní molekuly v buňkách a tkáních pomocí specifických protilátek. Protilátky vážou specificky antigeny v tkáních. Molekula imunoglobulinu má vazebná místa pro antigeny a pro jiné protilátky. Vazba antigenu s protilátkou je indikována barevnou histochemickou reakcí (Ramos-Vara & Miller, 2014). Tato detekční metoda se uplatňuje v patologii i imunologii. Využívá se principu vazby antigenu a protilátky. IHC dělíme na dvě základní metody průkazu. A to, metodu přímou a nepřímou. V současné době je nejvíce

používaná nepřímá metoda (Smetana Karel, 2011). Uplatnění imunohistochemických metod je velmi široké. Využívá se například k hodnocení složení buněčného infiltrátu u autoimunitních chorob, k diagnostice nádorů nejasného původu (primárních i metastatických), předpovědi prognózy nádorů (identifikace enzymů, specifických antigenů, onkogenů), široce se také používá k predikci terapeutické odpovědi, k určení funkce specifických genových produktů v základních biologických procesech. Uplatňují se také k potvrzení infekčního agens a detekci uložených imunokomplexů (Duraiyan et al., 2012).

6.4.1 Protilátky

Protilátky jsou látky bílkovinné povahy, jiným názvem také imunoglobuliny. Imunoglobuliny mají tvar „Y“ a skládají se ze dvou identických lehkých řetězců a dvou identických těžkých řetězců. Pro imunohistochemii se používají polyklonální i monoklonální protilátky. Monoklonální protilátky jsou produkovány technikou, kdy je zvíře imunizováno purifikovaným antigenem. B lymfocyty produkující specifickou protilátku jsou pak odebírány ze sleziny a fúzovány s myšími myelomovými buňkami za vzniku nesmrtelných hybridních buněk, které produkují Ig specifické pro jeden epitop. Tyto protilátky jsou produktem jednoho klonu B lymfocytů, proto jsou specifické. Polyklonální protilátky reagují s řadou antigenních epitopů na jedné určité molekule. Polyklonální protilátky jsou produkovány imunizací různých živočišných druhů (myš, králík kůň, křeček,) purifikovaným antigenem. Zvíře je imunizováno antigenem a začne produkovat protilátky. Polyklonální protilátky jsou citlivější a mají vyšší afinitu a širší reaktivitu, ale nižší specifitu ve srovnání s monoklonálními protilátkami (Beranová Milena, b.r.; Ramos-Vara & Miller, 2014; Smetana Karel, 2011).

6.4.2 Vazba antigen – protilátka

Vazebné místo protilátky je tvořeno variabilními doménami lehkých i těžkých řetězců. Vazebné místo protilátky se spojuje s antigenní determinantou. Protilátka nereaguje s celou molekulou, ale specificky s touto malou částí zvanou antigenní determinanta nebo epitop. Antigenní determinantu tvoří aminokyseliny nebo monosacharidy. Determinanta s vazebným místem se spojí, pokud jsou kompatibilní. Epitop rozeznává část protilátky nazývanou paratop. Specifická asociace antigenů a protilátek je

závislá na vodíkových můstcích, hydrofobních interakcích, elektrostatických silách a Van der Waalsových silách. Ty jsou slabé, nekovalentní povahy. Interakce silně závisí i na vzdálenosti mezi dvěma interagujícími molekulami. Vzniklý imunokomplex je komplex antigen – protilátka. Druhé vazebné místo váže další determinantu. Imunokomplex dokazuje kompatibilitu antigenu a protilátky. Protilátka rozezná antigen. Díky tomu, pomocí známé protilátky, můžeme identifikovat neznámý antigen nebo obráceně (Jílek Petr, 2008; Tsumoto & Caaveiro, 2016; Yang et al., 2014).

6.4.3 Odběr materiálu

Vzorky se odebírají šetrně a rychle. Pracovník se snaží, aby doba, kdy je nefixovaný vzorek v pokojové teplotě, byla co nejkratší. Preparáty je nutné rychle zpracovat a usušit. Fixování, parafinování, prosycení kryoprotektivem a zmrazení v tekutém dusíku jsou postupy, kterými lze minimalizovat destrukci antigenního epitopu. Při velmi nízkých teplotách lze bločky uchovávat několik let (Smetana Karel, 2011).

6.4.4 Příprava materiálu

Způsob, jakým se připravují buňky a tkáně závisí na použité metodě a na protilátce. Při mikroskopickém vyšetření se používají tkáně zalité do parafinu. Některé protilátky nebo antigeny jsou ale tak citlivé, že nesnesou tento způsob přípravy. V tomto případě lze použít tkáně zmrazené. Výhoda imunohistochemické analýzy je možnost vyšetřit i buňky v suspenzi. Tyto buňky se hodnotí formou nátěru. U většiny případů je potřeba tkáně a buňky fixovat a také permeabilizovat buněčné membrány. Fixace nám také napomáhá uchovat vzhled tkáně, což je velmi důležité pro patologické vyšetření. Jako nejčastější fixativ se používá paraformaldehyd. Dalším užívaným fixativem může být vychlazený aceton nebo metanol (Beranová Milena, b.r.; Smetana Karel, 2011).

6.4.5 Přímá imunohistochemie

Přímá imunohistochemie je nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni, protože protilátka je značena a aplikována na tkáň v rychlém jednokrokovém procesu. Primární protilátka je přímo značena, a to kovem, enzymem nebo fluoresceinem. Hodnotíme rozmístění tohoto značení ve tkáni.

Využívají se převážně v nativních preparátech. U parafinových řezů bývá metoda málo citlivá. Velkou nevýhodou je nutnost značit každou primární protilátku. Tato metoda se běžně nepoužívá i kvůli nedostatku amplifikace signálu, a tedy požadavku na vyšší koncentraci protilátky (Beranová Milena, b.r.; Magaki et al., 2019).

Obrázek 4 - princip přímé metody



Na antigen (Ag) v tkáni se naváže protilátka, která je značená (P) a hodnotí se rozmístění tohoto značení ve tkáni (Dvořák Karel et al., 2008) (převzato).

6.4.6 Nepřímá metoda

Při nepřímé metodě se využívá více jak jedna protilátka. Primární protilátka se naváže na antigen a poté se použije sekundární protilátka která je značena a naváže se na primární protilátku. Tento proces umožňuje amplifikaci signálu a použití s mnoha různými primárními protilátkami. Nemusí se značit každá primární protilátka, a proto je tato metoda více využívaná (Beranová Milena, b.r.; Magaki et al., 2019).

6.4.6.1 Nepřímá dvojstupňová metoda

Jak už bylo naznačeno, největší výhodou této metody je její citlivost. Oproti přímé metodě je daleko citlivější, ale také více komplikovaná než přímá metoda. Metoda využívá neznačenou primární protilátku (první protilátku) proti cílovému antigenu ve tkáni a značenou sekundární protilátku. Dárcem primární protilátky je zvíře (Chen et al., 2010). Po primární protilátce nanášíme sekundární protilátku, která rozeznává protilátku v prvním kroku a je schopna se na ni navázat. Jedná se o protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinu zvířete primární protilátky (Beranová Milena, b.r.). Fc-fragment je složen ze dvou těžkých řetězců. Vazbou na specifické proteiny Fc oblast zajišťuje, že každá protilátka generuje vhodnou imunitní odpověď pro daný antigen (bioatla, b.r.). Sekundární protilátka se značí fluorochromem nebo enzymem. Pomocí

histochemického substrátu katalytickou reakcí se prokáže enzymatická aktivita na příslušném místě (Beranová Milena, b.r.).

Obrázek 5 - princip nepřímé metody

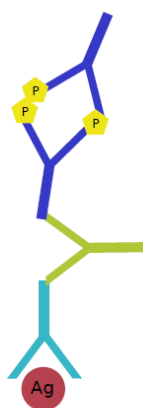


Na antigen se naváže primární neznačená protilátka, kterou rozezná sekundární protilátka. Sekundární protilátka je označena fluorochromem nebo enzymem. (Dvořák Karel et al., 2008)(převzato).

6.4.6.2 Nepřímá trojstupňová metoda

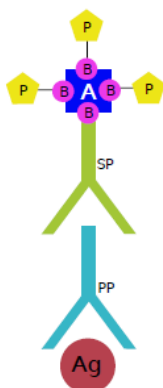
Metoda je používána v případě, že je množství antigenu v tkáni příliš nízké, slouží k zesílení signálu. V první řadě dochází k reakci specifického antiséra (primární protilátky) s cílovým antigenem ve tkáni. Poté se aplikuje neznačená protilátka, označována jako spojovací protilátka nebo můstek. Jedná se o specifickou protilátku proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky byly užity v prvním kroku. V poslední fázi se nanáší značený komplex. Metoda je velmi citlivá ale nevýhodou je její větší časová náročnost než u předešlých metod. Mezi nepřímé metody patří PAP a ABC metoda. PAP metoda využívá komplex, který se skládá z molekul peroxidázy a protilátek proti peroxidáze (Beranová Milena, b.r.). ABC metoda využívá k detekci avidin s biotinem. Metoda je založena na afinitě avidinu (nebo streptavidinu) k biotinu. Zkratka ABC znamená Avidin / Biotin Complex. Patří k nejcitlivějším metodám a je velmi využívána (CliniSciences, b.r.).

Obrázek 6 - princip trojstupňové nepřímé PAP metody



Na antigen je navázána primární protilátka, na kterou se naváže přemosťující (sekundární) protilátka. Na přemosťující protilátku je navázán komplex z tří molekul peroxidázy a dvou králíčích protilátek proti peroxidáze (Dvořák Karel et al., 2008) (převzato).

Obrázek 7- princip trojstupňové nepřímé ABC metody



Na primární protilátku je navázána sekundární protilátka a na tu se naváže komplex avidin – biotin – peroxidáza. Díky tomu dojde k výraznému zesílení signálu (Dvořák Karel et al., 2008) (převzato).

6.5 Markery fibrózy

Markery jsou biologičtí či biochemičtí ukazatelé, kteří jsou významní pro screening, včasnou diagnózu a stanovení patologických stavů.

6.5.1 Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)

α -SMA marker je znám také pod názvy jako alfa-aktin hladkého svalstva, SM α -aktin nebo ACTA2. α -SMA je izoforma aktinu, která zastává důležitou roli ve fibrogenезi. Aktiny hrají zásadní roli v mnoha buněčných procesech, včetně

buněčné proliferace, diferenciace, migrace a kontrakce. Fyziologicky se nachází v hladkých svalových buňkách v cévní stěně. α -SMA se používá jako marker pro podskupinu aktivovaných fibrogenních buněk v hojících se tkáních, je totiž exprimován myofibroblasty. Myofibroblasty mají důležitou roli ve fibrogenезi, protože proliferují a syntetizují velké množství ECM. α -SMA je marker aktivace diferenciace buněk hladkého svalů, a proto se využívá k identifikaci aktivovaných hvězdicových buněk, jenž vykazují myofibroblastický fenotyp (Shen Cherng et al., 2008; Shinde et al., 2017). Hvězdicové buňky jsou hlavními buňkami produkujícími kolagen a po své aktivaci exprimují α -SMA a aktivita těchto buněk je asociována s fibrózou (Washington et al., 2000).

6.5.2 Galektin 3

Galektiny jsou členy rodiny živočišných lektinů. Galektin 3 je zvířecí lektin vázající se na p-galaktosid. Galektin 3 se skládá ze dvou domén. Má karboxyterminální doménu, která obsahuje oblast vázající uhlohydráty a amino-terminální doménu. Amino-terminální doména se skládá primárně z tandemových opakování devíti aminokyselin pro zasíťování sacharidových a nesacharidových ligandů. Galektin 3 je pleiotropní molekula nacházející se v jádře, cytoplazmě a na buněčném povrchu. Podílí se na řadě biologických procesů (Henderson et al., 2006). Je důležitý při buněčném růstu, apoptóze, sestřihu pre-mRNA, diferenciaci, transformaci, angiogenezi, zánětu, fibróze a obrany hostitele (Dong et al., 2017). Galektin 3 je nejvíce exprimován v tkáňových makrofázích. Původně byl pozorován v myších peritoneálních makrofázích a pojmenován Mac-2 antigen. Ovlivňuje funkci makrofágů a přispívá k profibrotickému makrofágovému fenotypu vazbou na transmembránový receptor CD98. Předpokládá se, že zvýšená exprese galektinu 3 v chronicky zanícených tkáních aktivuje myofibroblasty, což vede k tvorbě jizev. Účinky galektinu 3 jsou při profibrotickém stavu široké, zahrnují epiteliální mezenchymální transdiferenciaci, apoptózu, aktivaci a proliferaci myofibroblastů, a to vede ke zvýšené produkci ECM (Slack et al., 2021).

6.5.3 Kolagenní vlákna

Průkazu kolagenních vláken se využívá hojně k diagnostice nadměrného ukládání vaziva. Základem kolagenních vláken je protein kolagen. Jedná se o biomolekulu produkovanou fibroblasty. Fibróza je charakterizována

nadměrnou akumulací proteinů a enzymů ECM, hlavně fibrilárních kolagenů. Fibroblasty jsou stimulovány k tvorbě vláken kolagenu. Při fibróze se zvyšuje kolagen v játrech, jako první začíná přibývat kolagen typu III. V pozdějších stádiích převládá kolagen typu I (Hall et al., 2021). Kolagenní fibrily typu I jsou tuhé struktury, které poskytují mechanickou odolnost a pevnost. Kolagenní fibrily typu III jsou tenčí než fibrily typu I (Buckley et al., 2013). Průkazu kolagenních vláken se využívá hojně k diagnostice nadměrného ukládání vaziva (Hall et al., 2021; Khatun & Ray, 2019).

7 Praktická část

7.1 Laboratorní zvířata

Studie byla provedena s dvaceti čtyřmi myšimi samci C57BL/6 ve věku 8 - 10 týdnů a hmotností 21,8-26,9 g. Myši byly chovány v 12hodinovém cyklu světlo/tma ve viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy a měly volný přístup k vodě a potravě. V této studii byla kontrolní skupina krmena standardní chow dietou (1314 -10mm pelety, Altromin, Německo), zatímco skupina CDAA (experimentální skupina) byla krmena dietou CDAA-HFD (A06071305, Research Diets, USA) po dobu 4 týdnů. CDAA-HFD je L-aminokyselinová dieta s 60 kcal % tuku s 0,1 % methioninu a bez přidaného cholinu. Byla použita čtyři zvířata na skupinu a od každého zvířete byly použity 3 řezy.

Po uplynutí 4 týdnů byla zvířata usmrcena v hluboké narkóze a byla odebrána krev z *vena cava inferior* a poté byla vyjmuta játra pro biochemickou, histologickou a imunohistochemickou analýzu.

Všem zvířatům byla poskytnuta péče v souladu se směrnicemi stanovenými Etickou komisí Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy pro zajištění pohody laboratorních zvířat. Experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat dle zákona 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a vyhlášky 419/2012 Sb. O ochraně pokusných zvířat.

7.2 Metodická část

7.2.1 Imunohistochemické barvení

7.2.1.1 Příprava pro imunohistochemické barvení

Játra byla fixována ve 4 % paraformaldehydu. Tkáně byly později zality do parafínu. Tkáňové bloky byly poté nakrájeny na mikrotomu na řezy o tloušťce 4,5 um. Řez byl přenesen na podložní sklíčko s kapkou destilované vody. Řez může být částečně shrnutý nebo nerovný. K narovnání byla použita vyhřívaná ploténka. Systematickým výběrem byly vybrány preparáty k imunohistochemické detekci.

Obrázek 8 – mikrotom



Mikrotom na kde byly nakrájené řezy pro analýzu (vlastní zpracování).

7.2.1.2 Imunohistochemické barvení α -SMA a galektinu 3

Pro detekci α -SMA a galektinu 3 byla užitá metoda nepřímé trojstupňové imunohistochemické metody. Pro detekci α -SMA a galektinu 3 byly užitý jiné primární a sekundární protilátky. Pro galektin 3 byla užitá primární protilátka anti galectin 3 (ředění 1:250, Invitrogen, 14-5310-82) a sekundární protilátka anti - Rat (ředění 1:200, Cell Signaling). Pro stanovení α -SMA byla užitá primární protilátka anti-Alfa Smooth Muscle Actin (ředění 1:1000, Abcam, ab124964) a sekundární protilátka Goat anti-Rabbit (ředění ready to use, Vector Laboratories, ZG0205). Všechny protilátky jsou polyklonální. Stanovení α -SMA a galektinu 3 bylo prováděno ABC metodou.

Zde popisují přesný postup práce. Řezy je nutné nejprve odparafinovat, rozpustit zalévací medium. Odparafinování řezů umožňuje pronikání vodných roztoků, které by se kvůli parafinu nedostaly do řezu. Řezy odparafinujeme v řadě roztoků, která zahrnuje třikrát xylene, aceton, 96 % Ethanol, 80 % Ethanol a 70 % Ethanol. V každé vaničce necháme řezy 5 minut a poté vložíme do další vany. Z poslední vany odparafinované řezy vložíme na 5 minut do PBS. Lázně alkoholů slouží k zavodnění tkáně. Poté vzorky vložíme na 2 minuty do 0,1 % Tritonu X-100. Triton X-100 se používá pro permeabilizaci membrány, aby se barva dostala dovnitř buňky. Řezy po permeabilizaci opláchneme 2 minuty v PBS a následně vložíme do 10mM citrátu sodného o pH 6.0 a necháme vařit

20 minut ve vodní lázni. Řezy poté necháme zchladnout a vložíme na 2 minuty do destilované vody. Antigeny mohou být obsazeny vlivem fixace. Tato místa se proto musí zpřístupnit pomocí pufru citrátu sodného. Po destilované vodě vložíme řezy dvakrát na 5 minut do PBS. Od tohoto kroku každý jeden oplach v PBS trvá 5 minut. Po oplachu v PBS sklíčka s řezy osušíme a preparáty označíme DAKO PENem. Pomocí pera Dako Pen lze kolem tkáňových řezů nakreslit kruh. Tento kruh poskytuje bariéru pro kapaliny, jako jsou roztoky protilátek nebo chromogenní substráty aplikované na řezy. A tím pomáhá získat jednotnější výsledky imunohistochemického barvení a umožňuje použít menší množství činidel. Poté následuje blokáda endogenní peroxidázy, vložíme sklíčka na 5 minut do 3 % peroxidu vodíku (30% peroxid do PBS, Penta Chemicals Unlimited). Poté vložíme sklíčka dvakrát do PBS. V další kroku dojde k blokování membrány. Blokovací roztok zaplní volná místa na membráně a díky tomu se bude protilátka vázat pouze na svůj specifický antigen. Mléko totiž zabráni vzniku nescifických vazeb s protilátkou. Řezy inkubujeme 60 minut s blokovacím roztokem 5 % mléka (0,5 g sušeného mléka, Cell Signaling). Inkubujeme a poté mléko sklepeme a přidáme Avidin/Biotin blokovací kit (Vector Laboratories). Každý roztok (avidinu a biotinu) se nechá inkubovat 15 minut. Dojde k blokaci pozadí. Dojde totiž k zablokování enzymu používaného k detekci, který se ale přirozeně vyskytuje v játrech. Reakce pozadí způsobuje falešnou pozitivitu. První nezačtený avidin vyváže veškerý volný endogenní biotin (není schopen reagovat později s ABC systémem). Roztok biotinu zablokuje zbývající místa na vazbu biotinu v předchozím avidinu. Po inkubaci každého roztoku dojde k oplachu v PBS. Po oplachu napipetujeme 50 µl primární protilátky, určené pro detekci daného profibrotického markeru, přímo na řezy tkání. Danou primární protilátku necháme inkubovat v lednici přes noc. Provedeme opatření, aby nedošlo k vyschnutí řezů. Vyschnutí tkáně může vést k falešně negativním výsledkům. Další den se řezy dvakrát promyjí v PBS a aplikuje se sekundární protilátka, kterou necháme inkubovat 30 minut. Po inkubaci sekundární protilátky a dvakrát promytí v PBS přidáme ABC roztok (5 ml PBS + 1 kapka činidla A + 1 kapka činidla B, Vector Laboratories), který má být připraven půlhodiny před aplikací. ABC komplex se naváže na sekundární protilátku a dojde k zesílení signálu. Po aplikaci a třicetiminutové inkubaci ABC roztoku řezy propláchneme dvakrát v PBS a nanese chromogen 3,3-

diaminobenzidin – DAB (1ml roztoku + 1 kapka chromogenu, Abcam). ABC komplex po inkubaci s chromogenním substrátem vytváří barevný produkt. Čas inkubace DAB je u každé detekce jiný. Pro detekci α -SMA je čas inkubace DAB 8 minut, u galektinu 3 jsou pro inkubaci DAB 2 minuty. Příliš dlouhá inkubační doba chromogenu by mohla vést k falešně pozitivnímu výsledku. A naopak příliš krátká inkubační doba může způsobit falešně negativní výsledky. Řezy po inkubaci DAB necháme 5 minut v destilované vodě. Po oplachu se řezy nechají barvit v bazickém barvivu hematoxylinu po dobu 45 sekund. Řezy vyjmeme a necháme po dobu 5 minut modrat pod tekoucí vodou.

Před montováním necháme řezy odvodnit. Řezy odvodníme vzestupnou alkoholovou řadou. Řada se skládá z oplachu v různých koncentracích acetonu a xylenu, konkrétně řezy ponecháme 3 minuty ve směsi aceton/xylen (9:1), 3 minuty ve směsi aceton/xylen (1:9) a 2 minuty ve třech lázních xylenu. V xylenu se řezy projasní. V poslední fázi provedeme montování. Jako montovací médium použijeme Eukitt (Sigma-Aldrich). Eukitt je nanášen pomocí tyčinky na podložní sklíčko, které je poté překryto krycím sklíčkem. Fixovaný preparát je připraven k mikroskopování.

7.2.1.3 Barvení kolagenních vláken

Barvení kolagenních vláken proběhlo metodou Sirius Red. Řezy je nutné také odparafinovat. Odparafinování provedeme v řadě roztoků od xylenu po 50 % Ethanol. Řezy následně promyjeme 5 minut v destilované vodě a poté osušíme a označíme DAKO PENem. Řezy vložíme a necháme barvit 2 minuty v hematoxylinu. Následně řezy vyjmeme a necháme po dobu 5 minut modrat pod tekoucí vodou. Po modrání necháme řezy 30 minut inkubovat v Sirius Red barvě. Po inkubaci opláchneme řezy v destilované vodě a následně provedeme oplach v 96 % Ethanolu. Následně už provedeme odvodnění a montování stejně jako při detekci α – SMA a galektinu 3. Tabulky níže obsahují všechny protokoly postupů v bodech.

Tabulka 1 - IHC protokol α -SMA

1. Předehřát vodní lázeň (60 °C +)
2. Deparafinizace (Xylen — → 70% Ethanol)
3. PBS **5 minut**
4. Permeabilizace: 0,1% Triton v PBS **2 minuty**
5. PBS **2 minuty**
6. Antigen retrieval – Citrátový pufr: vaření 20 minut, necháme zchladnout
7. Promytí v destilované vodě **2 minuty**
8. PBS **2x 5 minut** Příprava 3 % H₂O₂
9. Osušit podložní sklíčka, označit preparáty – DAKO PEN
10. 3 % H₂O₂ **5 minut**
11. PBS **2x 5 minut** Příprava blokovacího roztoku: 5% mléko
12. Blokace: Aplikace 5% roztoku mléka **60 minut**
13. AB Blocking Kit, aplikovat avidin **15 minut**
14. PBS **5 minut**
15. Aplikovat Biotin **15 minut**
16. PBS **5 minut**
17. Příprava primární protilátky: α SMA (ab124964), ředění: 1:1000
18. Aplikace primární protilátky: inkubace přes noc při 4 °C
19. PBS **2x 5 minut**
20. Aplikace sekundární protilátky anti-rabbit, ředění: ready to use
21. Inkubace se sekundární protilátkou **30 minut**
22. Příprava ABC roztoku (5mL PBS + 1 kapka činidla A + 1 kapka činidla B)
23. PBS **2x 5 minut**
24. Aplikace ABC **30 minut**
25. PBS **2x 5 minut**
26. Příprava DAB (1 mL roztoku + 1 kapka chromogenu)
27. Aplikace DAB **8 minut**
28. Destilovaná voda **5 minut**
29. Hematoxylin **45 sekund**
30. Proces modrání pod tekoucí vodou **5 minut**
31. Dehydratace: Aceton — → Xylen
32. Fixace krycích sklíček pomocí Eukitu

Tabulka 2 - IHC protokol Galectin-3

1. Předehřát vodní lázeň (60 °C +)
2. Deparafinizace (Xylen — → 70% Ethanol)
3. PBS **5 minut**
4. Permeabilizace: 0,1% Triton v PBS **2 minuty**
5. PBS **2 minuty**
6. Antigen retrieval – Citrátový pufr: vaření 20 minut, necháme zchladnout
7. Promytí v destilované vodě **2 minuty**
8. PBS **2x 5 minut** Příprava 3 % H₂O₂
9. Osušit podložní sklíčka, označit preparáty – DAKO PEN
10. 3 % H₂O₂ **5 minut**
11. PBS **2x 5 minut** Příprava blokovacího roztoku: 5% mléko
12. Blokace: Aplikace 5% roztoku mléka **30 minut**
13. AB Blocking Kit, aplikovat avidin **15 minut**
14. PBS **5 minut**
15. Aplikovat Biotin **15 minut**
16. PBS **5 minut**
17. Příprava primární protilátky Galectin-3 (14-5301-82), ředění 1:250 (mléko)
18. Aplikace primární protilátky: inkubace přes noc při 4 °C
19. PBS **2x 5 minut**
20. Aplikace sekundární protilátky anti-rat, ředění: 1:200 (v PBS)
21. Inkubace se sekundární protilátkou **30 minut**
22. Příprava ABC roztoku (5mL PBS + 1 kapka činidla A + 1 kapka činidla B)
23. PBS **2x 5 minut**
24. Aplikace ABC **30 minut**
25. PBS **2x 5 minut**
26. Příprava DAB (1 mL roztoku + 1 kapka chromogenu)
27. Aplikace DAB **2 minuty**
28. Destilovaná voda **5 minut**
29. Hematoxylin **45 sekund**
30. Proces modrání pod tekoucí vodou **5 minut**
31. Dehydratace: Aceton — → Xylen
32. Fixace krycích sklíček pomocí Eukitu

Tabulka 3 - Protokol Sirius Red

1. Deparafinizace (Xylen — → 50% Ethanol)
2. Promytí v destilované vodě **5 minut**
3. Osušit podložní sklíčka, označit preparáty – DAKO PEN
4. Hematoxylin **2 minuty**
5. Proces modrání pod tekoucí vodou **5 minut**
6. Sirius Red **30 minut**
 - Sirius Red činidlo musí být chráněno před světlem.
 - Během inkubace jsou preparáty zakryty.
7. Destilovaná voda **Oplach**
8. 96% Ethanol **Oplach**
9. Dehydratace: Aceton — → Xylen
10. Fixace krycích sklíček pomocí Eukitu

7.2.1.4 Mikroskopování

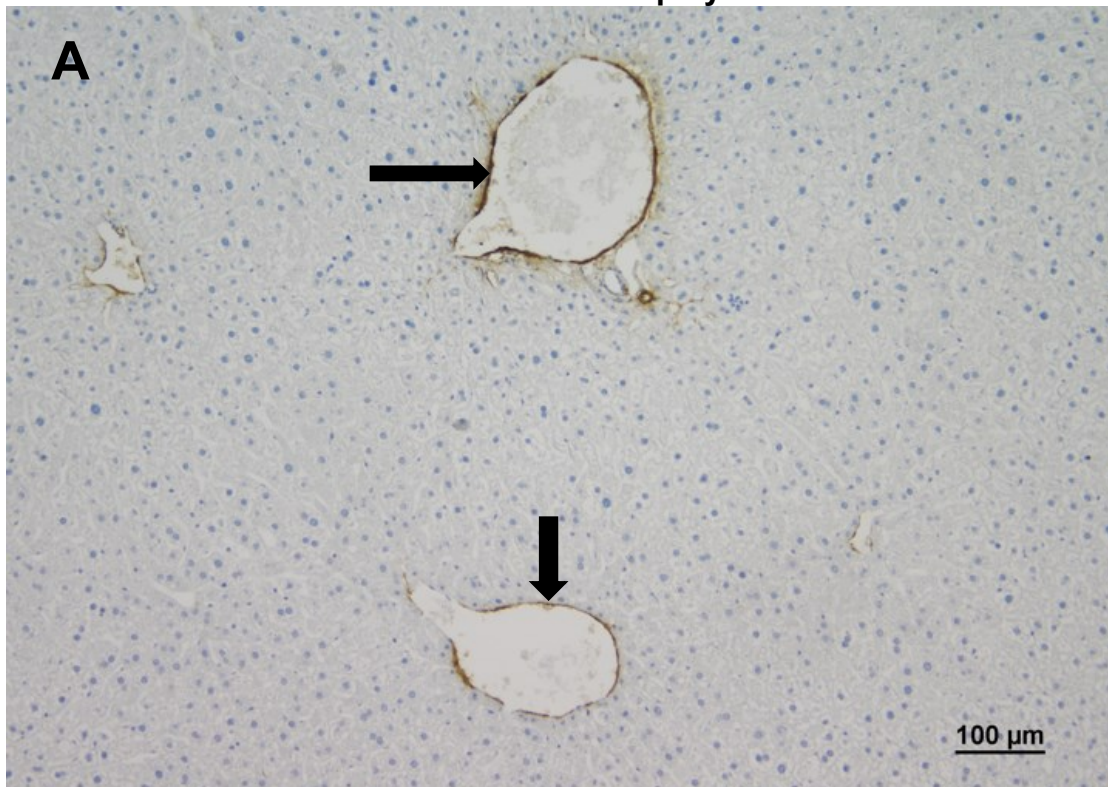
U tkání byla použita zvětšení 100krát a 200krát.

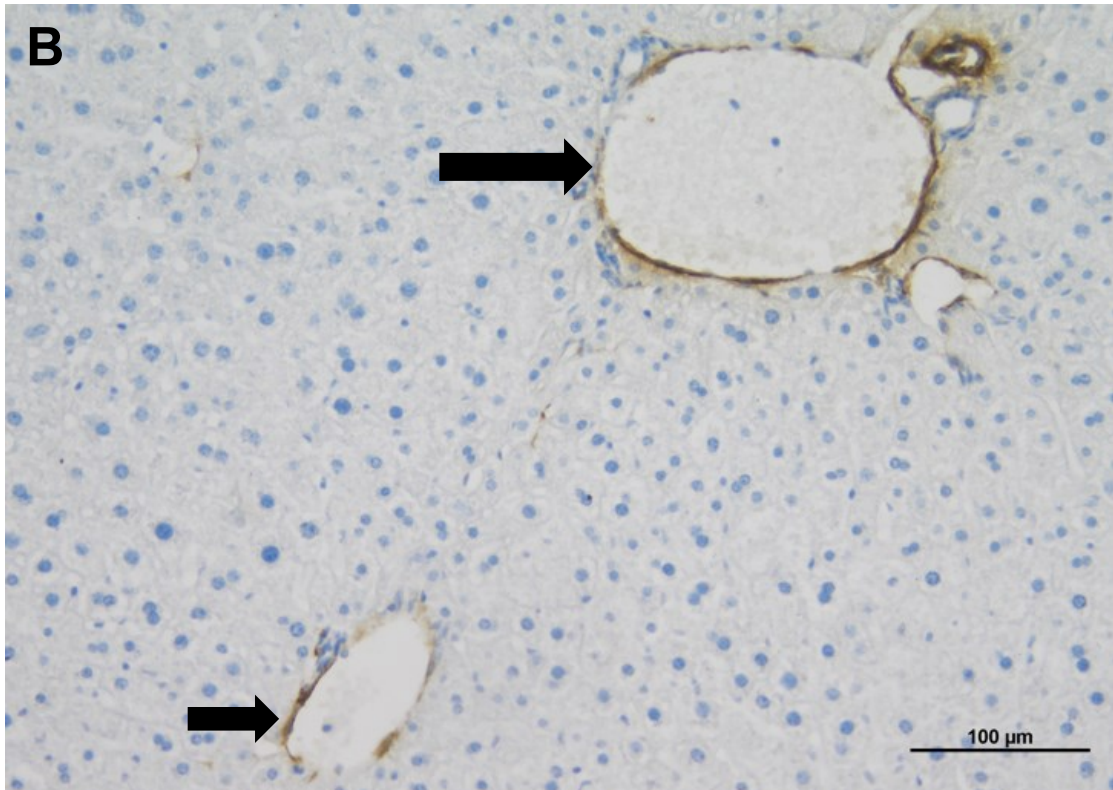
8 Výsledky

8.1 Detekce α -SMA v játrech

Imunohistochemická analýza α -SMA u kontrolní skupiny (A, B) a experimentální skupiny (C, D). Expres α -SMA byla u kontrolních zvířat slabá, většinou byla detekována v hladkých svalových buňkách centrální žíly a portální triády venul a arteriol. Dieta CDAA zvýšila intenzitu barvení α -SMA. Pozitivita byla stále patrná v buňkách hladké svaloviny centrální žíly, portální triády a arteriol. Kromě toho byla pozitivita zjištěna i v aktivovaných jaterních hvězdicových buňkách a myofibroblastech v jaterním parenchymu.

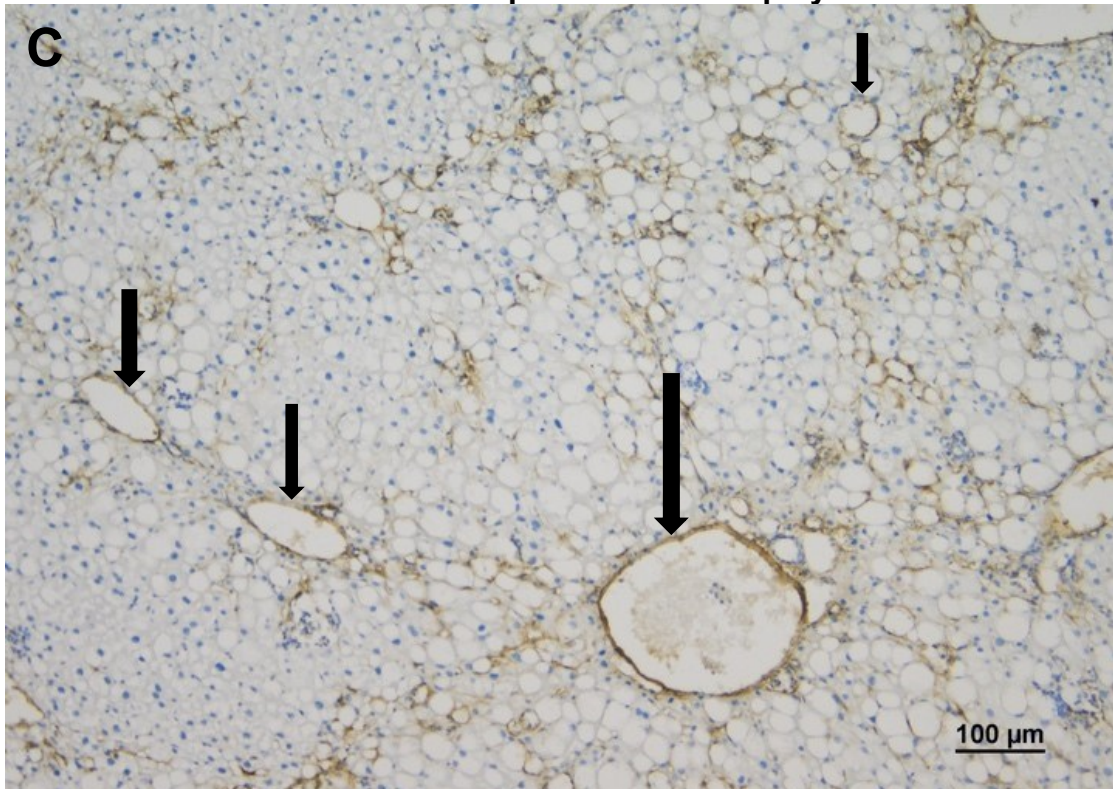
Obrázek 9 - detekce α -SMA u kontrolní skupiny

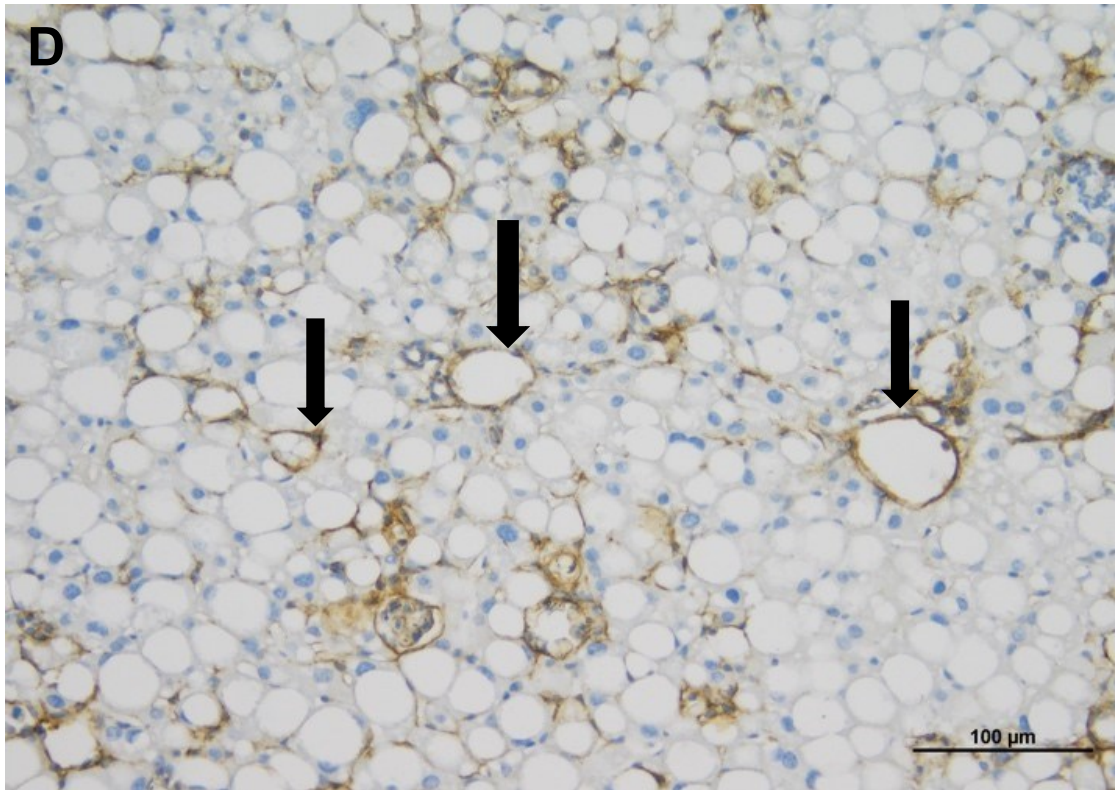




Expres α -SMA v hnědé barvě (šipky) v játrech kontrolní skupiny (A, B). Měřítka 100 μ m pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

Obrázek 10 - detekce α -SMA u experimentální skupiny



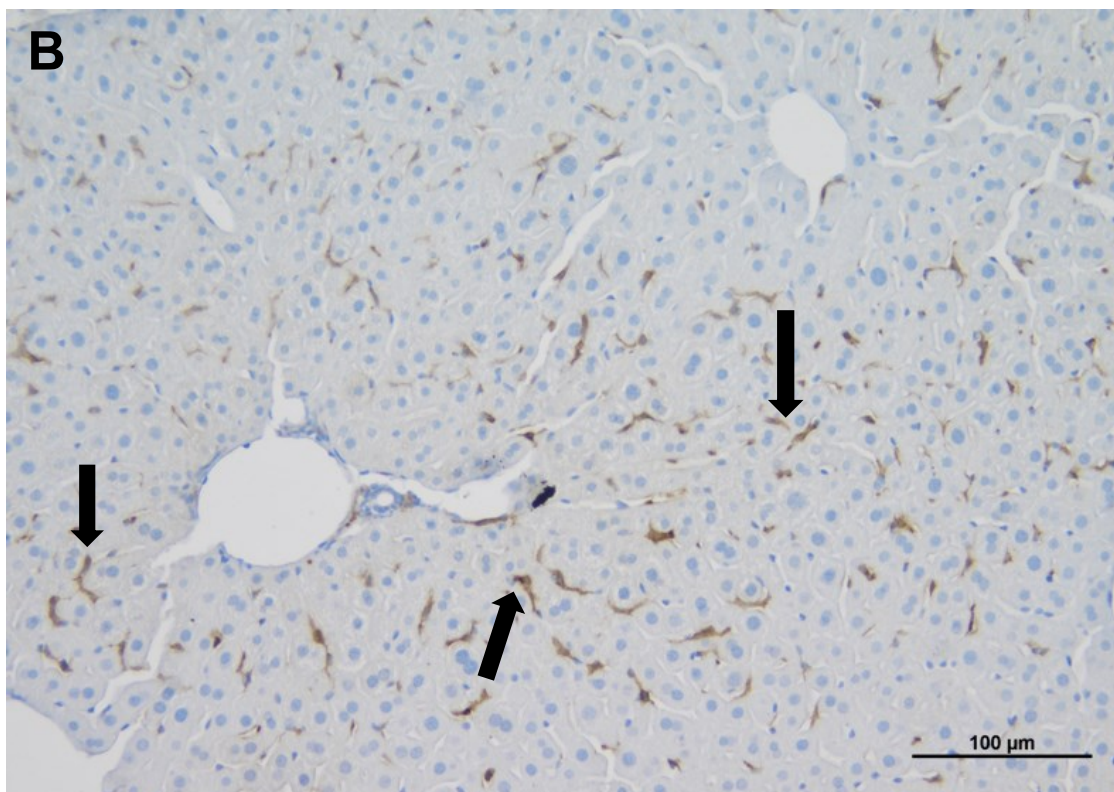
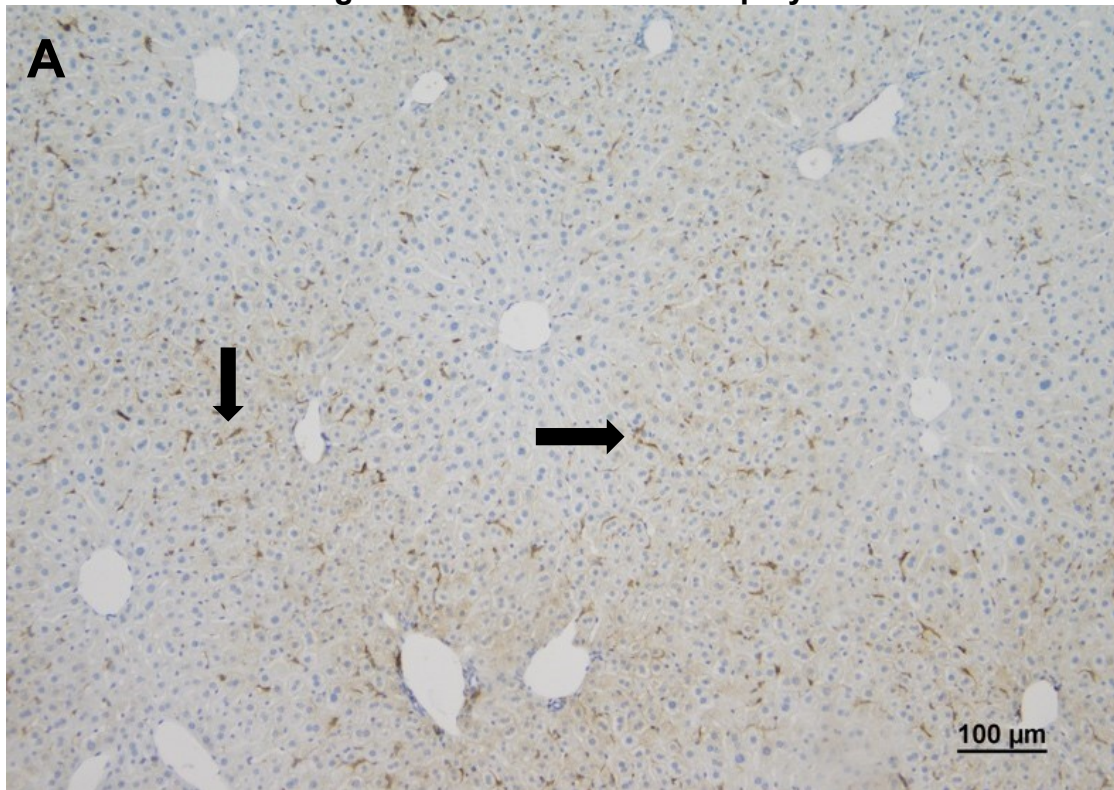


Expres α -SMA v hnědé barvě (šipky) u experimentální skupiny (C, D). Měřítka 100 μ m pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

8.2 Detekce galektinu 3 v játrech

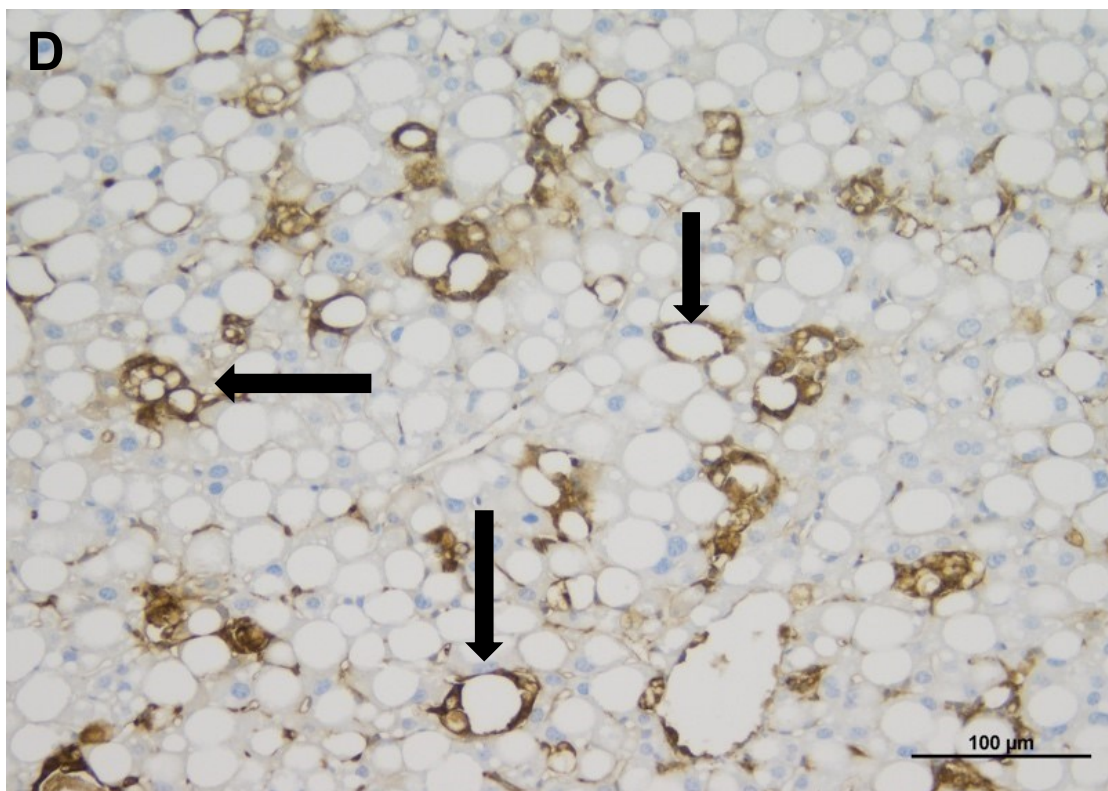
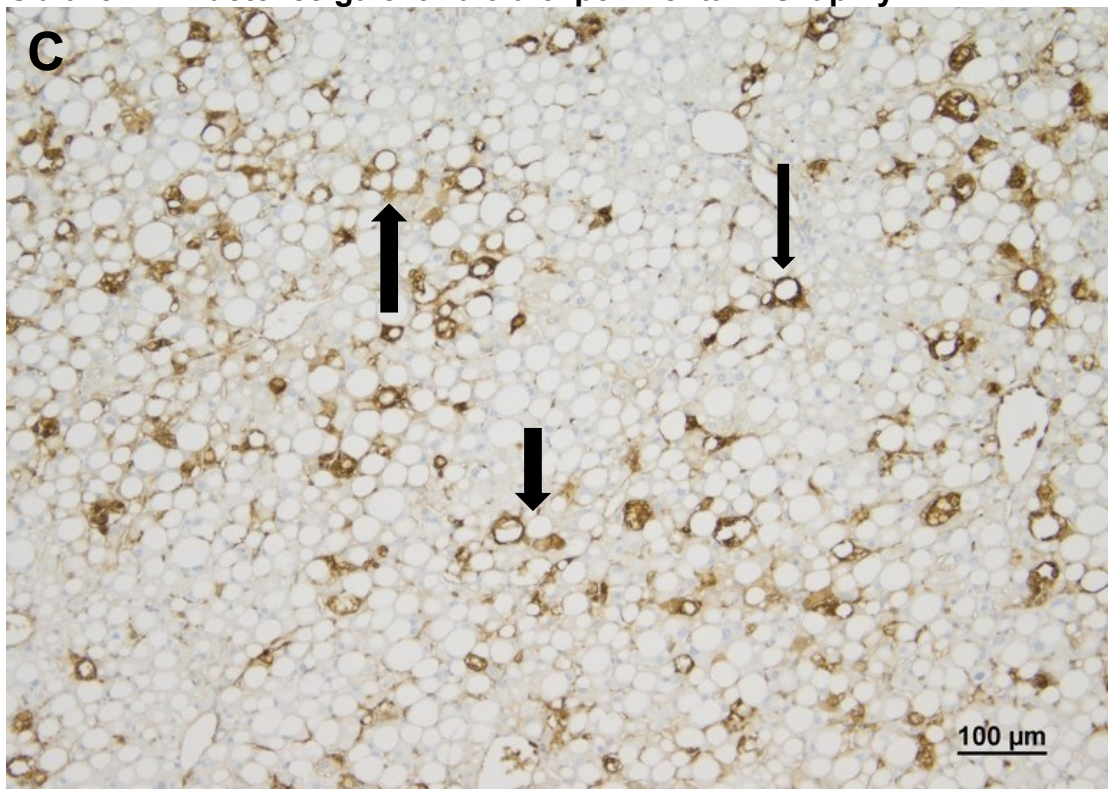
Imunohistochemická analýza galektinu 3 u kontrolní skupiny (A, B) a experimentální skupiny (C, D). Barvení galektinu 3 bylo v játrech kontrolních myší velmi nízké a ukazovalo na přítomnost Kupfferových buněk. Silná pozitivita pro galektin 3 byla detekována u myší s CDAA dietou v jaterním parenchymu, což naznačuje progresi zánětu u těchto myší.

Obrázek 11 - detekce galektinu 3 u kontrolní skupiny



Lokalizace makrofágů (šipky, hnědá pozitivita) v játrech kontrolní skupiny (A, B). Měřítka 100 μm pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

Obrázek 12 - detekce galektinu 3 u experimentální skupiny



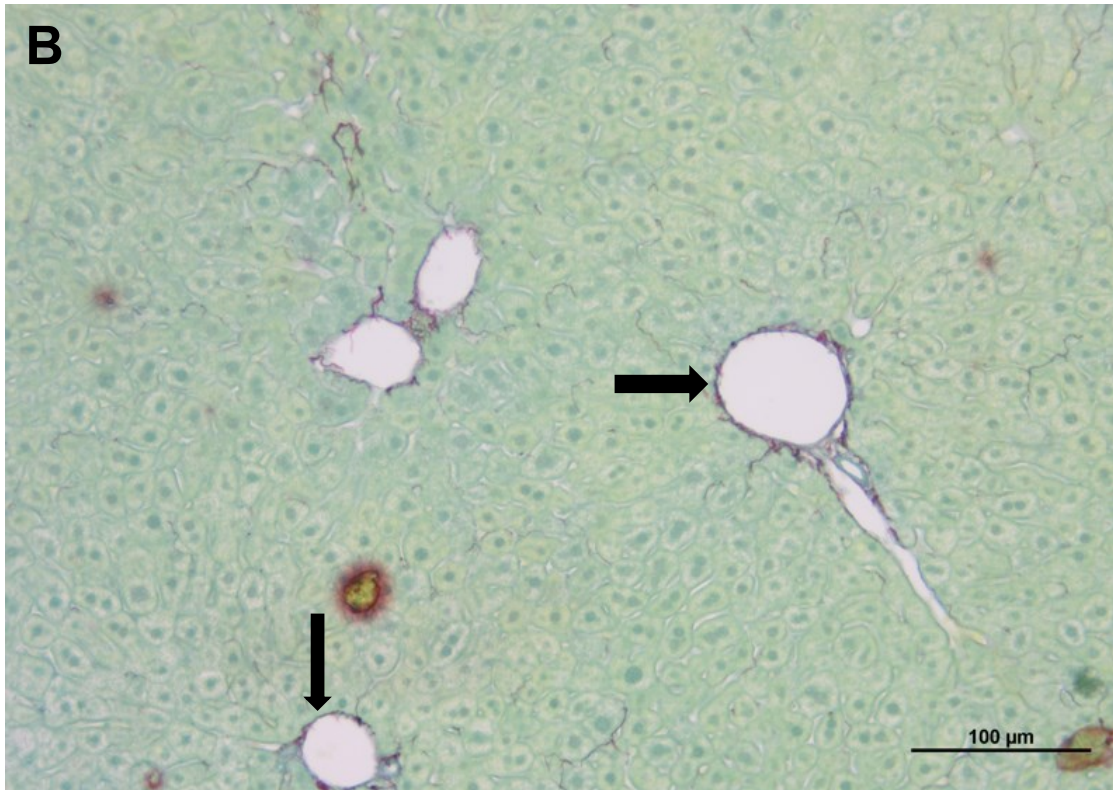
Lokalizace makrofágů (šipky, hnědá pozitivita) u experimentální skupiny (C, D). Měřítko 100 μm pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

8.3 Detekce kolagenu v játrech

Imunohistochemická analýza kolagenu u kontrolní skupiny (A, B) a experimentální skupiny (C, D). Barvení Siriusovou červení bylo u kontrolní skupiny zjištěno pouze v buňkách hladké svaloviny v centrální žíle a v arteriolách a venulách v portální oblasti. Dieta CDAA vedla ke zvýšené pozitivitě po barvení Siriusovou červení v jaterním parenchymu. Kolagenní vlákna byla detekována i mimo hladké svalové buňky cév, což naznačuje rozvoj mírné jaterní fibrózy.

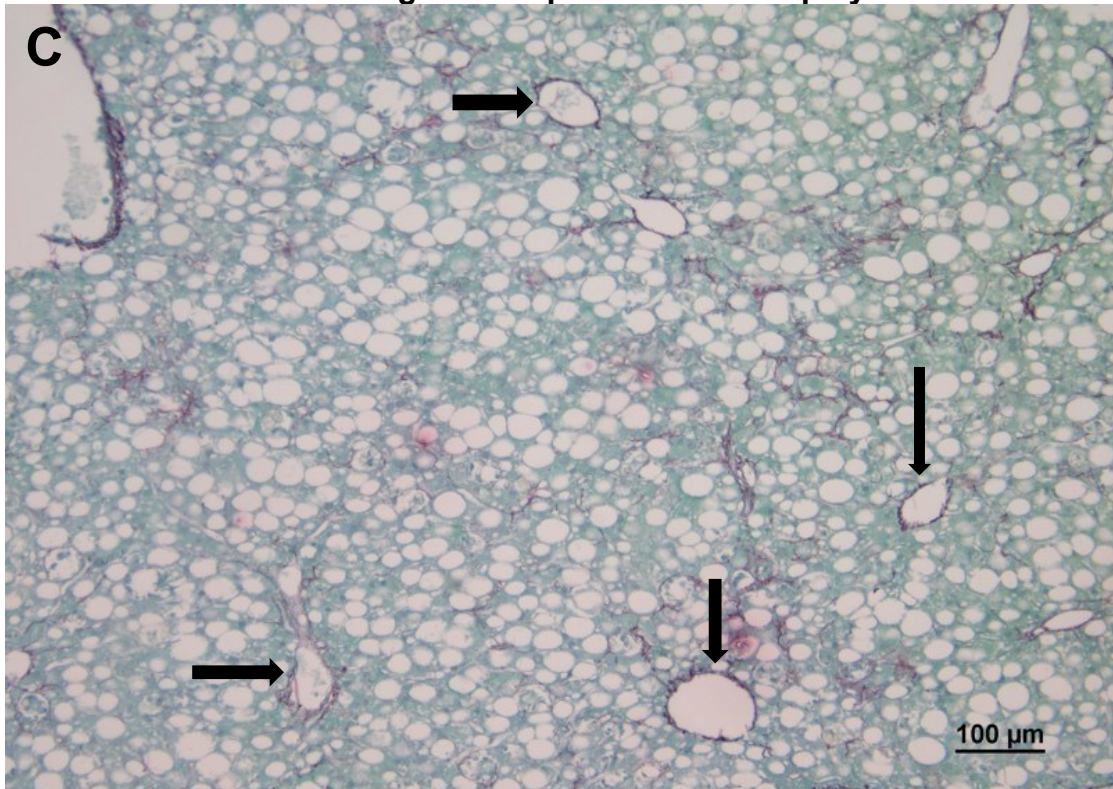
Obrázek 13 - detekce kolagenu u kontrolní skupiny

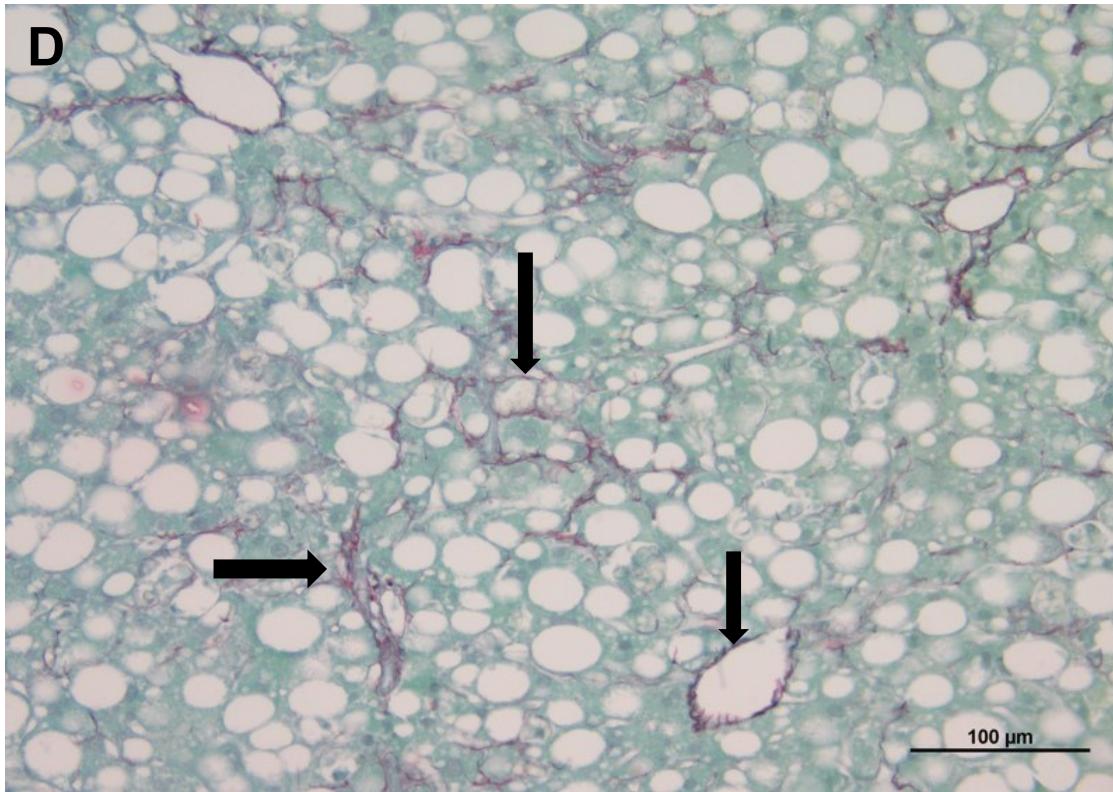




Barvení Siriusovou červení detekující kolagen (šipky) v játrech kontrolní skupiny (A, B). Měřítka 100 μm pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

Obrázek 14 - detekce kolagenu u experimentální skupiny





Barvení Siriusovou červení detekující kolagen (šipky) u experimentální skupiny (C, D). Měřítka 100 μm pro zvětšení 100x a 200x (vlastní zpracování).

9 Diskuze

Nealkoholové ztučnění jater (NAFLD) je zastřešující termín pro stav, jež je charakterizován hromaděním přebytečného tuku v jaterní tkáni, které není způsobeno nadměrnou konzumací alkoholu (Byrne & Targher, 2015). V rámci fyziologických procesů je normální, že játra obsahují určité množství tukových buněk. Avšak pokud více než 5-10 % hmotnosti jater je tvořeno tukem, pak hovoříme o ztučnělých játrech (steatóze) (Orešič et al., 2013). Zvýšené riziko rozvoje NAFLD se vyskytuje u lidí, kteří mají nadváhu či jsou obézní, mají diagnostikovaný diabetes mellitus druhého typu, vykazují zvýšené hladiny celkového cholesterolu a triglyceridů, anebo mají metabolický syndrom (kombinace obezity, vysokého krevního tlaku a diabetu) (Fabbrini et al., 2010). U některých jedinců s NAFLD se může vyvinout NASH agresivní formu ztučnění jater. NASH se vyznačuje zánětem jaterní tkáně a může progredovat do pokročilého zjizvení (cirhózy) (Stál, 2015). Během NASH jsou játra typicky zanícená a oteklá, což přímo poškozuje jaterní tkáň. V místě poškození postupem času dochází ke zmnožení vaziva a rozvoji fibrózy (Heyens et al., 2021). Cirhóza jater vzniká v důsledku těžkého poškození jater, kdy tvrdá vazivová tkáň postupně nahrazuje zdravou jaterní tkáň a zpomaluje tak činnost jater. V konečném důsledku může dojít k selhání jaterních funkcí (Cha et al., 2018).

Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) je považován za stěžejní marker aktivovaných jaterních hvězdicových buněk (Nouchi et al., 2008). Jaterní hvězdicové buňky hrají zásadní roli ve fyziologii jater a fibrogenезi. Jsou lokalizovány v Disseho prostoru a vytváří těsné interakce se sinusoidálními endotelovými buňkami a epitelovými buňkami (Asahina et al., 2009). Když je jaterní tkáň poškozena patologickým procesem (působení jaterních toxinů či virové infekce), jaterní hvězdicové buňky přijímají signály z poškozených hepatocytů a buněk imunitního systému, což způsobuje jejich transdiferenciaci na aktivované myofibroblasty (Kisseleva, 2017). Při chronickém jaterním onemocnění vede prodloužená a opakovaná aktivace hvězdicových buněk k rozvoji jaterní fibrózy, která je charakterizována rozsáhlou tvorbou jizev a narušením architektury a funkce jater (Ramadori et al., 1990). Pro klasifikaci přechodu hvězdicových buněk z klidového do aktivovaného stavu hraje detekce

α -SMA významnou roli. Souhrnně lze říct, že hvězdicové buňky jsou hlavními buňkami produkujícími kolagen u celé řady jaterních onemocnění a po své aktivaci exprimují α -SMA. Aktivita těchto buněk je asociována s fibrózou, nekrozánětlivou aktivitou a steatózou (Washington et al., 2000).

Pro posouzení statusu hvězdicových buněk (klidový stav vs. aktivovaný stav) byla v rámci této bakalářské práce provedena analýza exprese α -SMA. U kontrolní skupiny na chow dietě byla pozorována pouze slabá exprese α -SMA, a to zejména v buňkách hladkého svalstva centrální žíly, arteriol a venul portální triády. Podávání CDAA diety vedlo k signifikantnímu zvýšení exprese α -SMA v hladkosvalových buňkách centrální žíly, arteriol, venul portální triády, ale také v aktivovaných jaterních hvězdicových buňkách a myofibroblastech jaterního parenchymu. Tyto výsledky ukazují na rozvoj procesu fibrózy u experimentální skupiny, jež byla krmena CDAA dietou za účelem indukce NAFLD.

Jaterní fibróza je spojena s velkými změnami jak v množství, tak ve složení extracelulární matrix (Kaufman & Hamburger, 1992). V pokročilých stádiích játra obsahují přibližně šestkrát více extracelulární matrix než obvykle, a to včetně kolagenů (I, III a IV), fibronektinu, elastinu či proteoglykanů. Akumulace extracelulární matrix je výsledkem jak její zvýšené syntézy, tak její snížené degradace (Arthur et al., 2000). Hvězdicové buňky jsou hlavními buňkami produkujícími extracelulární matrix v poraněné jaterní tkáni (Gäbele et al., 2003). Po chronickém poranění hvězdicové buňky získávají kontraktilní, prozánětlivé a fibrogenní vlastnosti (Bataller & Brenner, 2005). Aktivované hvězdicové buňky migrují do místa poranění, kde produkují velké množství extracelulární matrix a regulují její degradaci. Syntéza kolagenu hvězdicovými buňkami je regulována na transkripční i posttranskripční úrovni. Zvýšená stabilita mRNA kolagenu tudíž vede ke zvýšené syntéze kolagenu v aktivovaných hvězdicových buňkách (Huan et al., 2015).

V rámci histochemické analýzy pro selektivní zvýraznění kolagenních vláken ve vzorcích jaterní tkáně byla zvolena metoda barvení Sirius Red. Při Sirius Red barvení dochází ke vzniku specifické reakce s kolagenem, respektive typu I a III kolagenních vláken. Kontrolní skupina vykazovala

přítomnost kolagenních vláken pouze v buňkách hladkého svalstva v centrální žíle, v arteriolách a venulách v portální oblasti. V porovnání s experimentální skupinou došlo k detekci zvýšené exprese kolagenu v jaterním parenchymu mimo buňky hladké svaloviny krevních cév. Sirius Red barvení tedy prokázalo vývoj mírné jaterní fibrózy u experimentální skupiny, a to v důsledku zvýšených depozit kolagenu.

Rozsáhlá experimentální i klinická data podporují hypotézu, že makrofágy hrají ústřední roli ve vývoji NAFLD i NASH (Cha et al., 2018). Kuppferovy buňky sídlící v játrech, jakožto forma tkáňových makrofágů, iniciují zánět a pomáhají přitahovat monocyty z krevního řečiště. Obě formy (monocyty a Kuppferovy buňky) se diferencují na prozánětlivé makrofágy a podporují progresi NAFLD (Krenkel & Tacke, 2017). Molekuly lipidů a lipidové metabolity patří mezi hlavní faktory přispívající k aktivaci makrofágů u NAFLD. Mimo to, makrofágy přítomné v tukové tkáni jsou asociovány se ztučněním jater prostřednictvím jejich účinků na chronický zánět, a to zejména v důsledku sekrece cytokinů a adipokinů (Liang et al., 2022).

Pro vyhodnocení zánětlivého stavu byla vybrána detekce galektinu 3, který reguluje adhezi, chemotaxi a apoptózu makrofágů. Barvení galektinem 3 poskytlo slabou reakci ve vzorcích jaterní tkáně u kontrolní skupiny reflektující nízkou míru přítomnosti Kuppferových buněk. Naproti tomu, analýza exprese galektinu 3 u experimentální skupiny poskytla silnou pozitivitu v jaterním parenchymu, což naznačuje progresi zánětu u této skupiny.

10 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnocení rozvoje fibrózy u experimentálního myšího modelu, jemuž byl podáváním CDAA diety indukován rozvoj NAFLD. Pro detekci znaků fibrózy byla zvolena imunohistochemická analýza profibrotických markerů α -SMA, galektin 3 a kolagenních vláken. Výsledky této analýzy ukazují na probíhající zánětlivou reakci i fibrózu v jaterní tkáni u experimentální skupiny. Lze konstatovat, že exprese vybraných markerů vykazovala u experimentální skupiny (CDAA dieta) výrazně vyšší pozitivitu než u skupiny kontrolní (chow dieta).

11 Seznam obrázků

Obrázek 1 - zevní pohled jater	8
Obrázek 2 - Schéma jaterních lalůček a jaterního acinu	11
Obrázek 3 - stádia NAFLD	15
Obrázek 4 - princip přímé metody	22
Obrázek 5 - princip nepřímé metody	23
Obrázek 6 - princip trojstupňové nepřímé PAP metody	24
Obrázek 7- princip trojstupňové nepřímé ABC metody	24
Obrázek 8 – mikrotom	28
Obrázek 11 - detekce α -SMA u kontrolní skupiny	34
Obrázek 12 - detekce α -SMA u experimentální skupiny	35
Obrázek 13 - detekce galektinu 3 u kontrolní skupiny	37
Obrázek 14 - detekce galektinu 3 u experimentální skupiny	38
Obrázek 15 - detekce kolagenu u kontrolní skupiny.....	39
Obrázek 16 - detekce kolagenu u experimentální skupiny	40

12 Seznam tabulek

Tabulka 1 - IHC protokol α -SMA	31
Tabulka 2 - IHC protokol Galectin-3	32
Tabulka 3 - Protokol Sirius Red.....	33

13 Použité zdroje

1. Acharya, P., Chouhan, K., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2021). Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.671640>
2. Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A., Burn, J., & Diamond, A. G. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology*, 217(1), 42–53. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9534>
3. Asahina, K., Tsai, S. Y., Li, P., Ishii, M., Maxson, R. E., Sucov, H. M., & Tsukamoto, H. (2009). Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*, 49(3), 998–1011. <https://doi.org/10.1002/hep.22721>
4. Asgharpour, A., Cazanave, S. C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B. A., Kumar, D. P., Daita, K., Min, H.-K., Mirshahi, F., Bedossa, P., Sun, X., Hoshida, Y., Koduru, S. V., Contaifer, D., Warncke, U. O., Wijesinghe, D. S., & Sanyal, A. J. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology*, 65(3), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>
5. Atlas of plant and animal histology. (b.r.). *Cell types HEPATOCYTE*. Získáno 13. duben 2023, z <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/hepatocito.php>
6. Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
7. Bauer, K. C., Littlejohn, P. T., Ayala, V., Creus-Cuadros, A., & Finlay, B. B. (2022). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Gut-Liver Axis: Exploring an Undernutrition Perspective. *Gastroenterology*, 162(7), 1858-1875.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.01.058>

8. Bellentani, S., Scaglioni, F., Marino, M., & Bedogni, G. (2010). Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Diseases*, 28(1), 155–161. <https://doi.org/10.1159/000282080>
9. Beranová Milena, T. Z. (b.r.). *Principy a příklady imunohistochemie příručka pro studenty*. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni.
10. bioatla. (b.r.). *Antibody Structure*. Získáno 15. duben 2023, z <https://www.bioatla.com/appendix/antibody-structure/>
11. Brůha, R. (2019). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Vnitřní lékařství*, 65(9), 571–575.
12. Buckley, M. R., Evans, E. B., Matuszewski, P. E., Chen, Y.-L., Satchel, L. N., Elliott, D. M., Soslowsky, L. J., & Dodge, G. R. (2013). Distributions of types I, II and III collagen by region in the human supraspinatus tendon. *Connective Tissue Research*, 54(6), 374–379. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.847096>
13. Byrne, C. D., & Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(1), S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>
14. CliniSciences. (b.r.). *Immunohistochemistry protocol - Avidin/Biotin Method (ABC)*. Získáno 15. duben 2023, z <https://www.clinisciences.com/en/read/immunohistochemistry-immunofluorescence-659/immunohistochemistry-protocol-avidin-2216.html>
15. Čihák Radomír. (2013). Hepar - Játra. In *Anatomi 2, třetí vydání* (s. 143–146). Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-9552-3
16. Dong, R., Zhang, M., Hu, Q., Zheng, S., Soh, A., Zheng, Y., & Yuan, H. (2017). Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3311>
17. Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 4(6), 307. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>
18. Dvořák Karel, Zdeňka Dvořáková, Josef Feit, Zdeněk Lukáš, & Jana Šmardová. (2008). Základy imunohistochemie. In *Základy*

- histopatologických vyšetřovacích metod* (s. 75–85).
<https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf>, verze 0.61 (12. května 2008)
19. Dylevský Ivan. (2009). Játra. In *FUNKČNÍ ANATOMIE* (s. 331–334). © Grada Publishing, a.s.,. ISBN 978-247-7030-7
20. Ehrmann Jiří, H. P. a kolektiv. (2014). *HEPATOLOGIE 2. VYDÁNÍ*. Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-8021-4
21. Elpek, G. Ö. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7260. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7260>
22. Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679–689. <https://doi.org/10.1002/hep.23280>
23. Flessa, C.-M., Nasiri-Ansari, N., Kyrou, I., Leca, B. M., Lianou, M., Chatzigeorgiou, A., Kaltsas, G., Kassi, E., & Randeva, H. S. (2022). Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15791. <https://doi.org/10.3390/ijms232415791>
24. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 24(7), 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
25. Funkce buněk lidského těla • Multimediální skripta. (b.r.). 4. *Játra a biotransformace xenobiotik*. Získáno 29. března 2023, z <http://fbt.cz/>
26. Gäbele, E., Brenner, D. A., & Rippe, R. A. (2003). Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, d69-77. <https://doi.org/10.2741/887>
27. Hall, A., Cotoi, C., Luong, T. V., Watkins, J., Bhathal, P., & Quaglia, A. (2021). Collagen and elastic fibres in acute and chronic liver injury. *Scientific Reports*, 11(1), 14569. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93566-1>

28. Henderson, N. C., Mackinnon, A. C., Farnworth, S. L., Poirier, F., Russo, F. P., Iredale, J. P., Haslett, C., Simpson, K. J., & Sethi, T. (2006). Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(13), 5060–5065. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511167103>
29. Heyens, L. J. M., Busschots, D., Koek, G. H., Robaey, G., & Francque, S. (2021). Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Medicine*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.615978>
30. Huan, Q., Wang, Y., Yang, L., Cui, Y., Wen, J., Chen, J., & Chen, Z.-J. (2015). Expression and function of the ID1 gene during transforming growth factor- β 1-induced differentiation of human embryonic stem cells to endothelial cells. *Cellular reprogramming*, *17*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0020>
31. Cha, J.-Y., Kim, D.-H., & Chun, K.-H. (2018). The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Laboratory animal research*, *34*(4), 133–139. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.133>
32. Chen, X., Cho, D.-B., & Yang, P.-C. (2010). Double staining immunohistochemistry. *North American journal of medical sciences*, *2*(5), 241–245. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2241>
33. Ibrahim, S. H., Hirsova, P., Malhi, H., & Gores, G. J. (2016). Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*, *61*(5), 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>
34. Jackson, K. G., Way, G. W., & Zhou, H. (2022). Bile acids and sphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease. *Chinese Medical Journal*, *135*(10), 1163–1171. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002156>
35. Jiang, M., Wu, N., Chen, X., Wang, W., Chu, Y., Liu, H., Li, W., Chen, D., Li, X., & Xu, B. (2019). Pathogenesis of and major animal models used for nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of*

- International Medical Research*, 47(4), 1453–1466.
<https://doi.org/10.1177/0300060519833527>
36. Jílek Petr. (2008). Antigeny. In *ZÁKLADY IMUNOLOGIE* (s. 27–43). ANYWAY, s.r.o.
37. Kaufman, J. S., & Hamburger, R. J. (1992). Acute effects of indomethacin on the disposition of a potassium load. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119(1), 25–31.
38. Khatun, M., & Ray, R. B. (2019). Mechanisms Underlying Hepatitis C Virus-Associated Hepatic Fibrosis. *Cells*, 8(10), 1249.
<https://doi.org/10.3390/cells8101249>
39. Kisseleva, T. (2017). The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology*, 65(3), 1039–1043.
<https://doi.org/10.1002/hep.28948>
40. Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature reviews. Immunology*, 17(5), 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
41. Liang, W., Qi, Y., Yi, H., Mao, C., Meng, Q., Wang, H., & Zheng, C. (2022). The Roles of Adipose Tissue Macrophages in Human Disease. *Frontiers in immunology*, 13, 908749.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.908749>
42. Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). *An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry* (s. 289–298). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
43. Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Medicine*, 18(3), 245–250.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>
44. McCuskey, R. S., & McCuskey, P. A. (1990). Fine structure and function of kupffer cells. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 14(3), 237–246. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060140305>
45. Nahon, P., Allaire, M., Nault, J.-C., & Paradis, V. (2020). Characterizing the mechanism behind the progression of NAFLD to hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*, 7(4).
<https://doi.org/10.2217/hep-2020-0017>

46. Nouchi, T., Tanaka, Y., Tsukada, T., Sato, C., & Marumo, F. (2008). Appearance of α -smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver*, 11(2), 100–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1991.tb00499.x>
47. Orešič, M., Hyötyläinen, T., Kotronen, A., Gopalacharyulu, P., Nygren, H., Arola, J., Castillo, S., Mattila, I., Hakkarainen, A., Borra, R. J. H., Honka, M.-J., Verrijken, A., Francque, S., Iozzo, P., Leivonen, M., Jaser, N., Juuti, A., Sørensen, T. I. A., Nuutila, P., ... Yki-Järvinen, H. (2013). Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia*, 56(10), 2266–2274. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2981-2>
48. Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>
49. Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2016). Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1062–1079. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.006>
50. Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, prof. MUDr. Petr Hůlek, & kolektiv. (2014). *HEPATOLOGIE*. Grada Publishing, a.s.
51. Pujitha Kudaravalli; Savio John. (2022). *Nonalcoholic Fatty Liver*. StatPearls Publishing.
52. Ramadori, G., Veit, T., Schwögler, S., Dienes, H. P., Knittel, T., Rieder, H., & Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1990). Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology*, 59(6), 349–357. <https://doi.org/10.1007/BF02899424>
53. Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
54. Shen Cherng, Jenny Young, & Hongbao Ma. (2008). Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). *The Journal of American Science*.

https://www.researchgate.net/publication/228480692_Alpha-smooth_muscle_actin_a-SMA

55. Shinde, A. V., Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2017). The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(1), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.006>
56. Slack, R. J., Mills, R., & Mackinnon, A. C. (2021). The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 130, 105881. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105881>
57. Smetana Karel, B. J. P. M. a kolektiv. (2011). Imunohistochemické metody. In *Vyšetřovací metody v imunologii, 2. vydání* (s. 76–78). Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-3533-7
58. Song, H. K., & Hwang, D. Y. 978-80-247-3533-7 (2017). Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory Animal Research*, 33(2), 119. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>
59. Stål, P. (2015). Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. *World Journal of Gastroenterology*, 21(39), 11077. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.11077>
60. Subramanian, P., Hampe, J., Tacke, F., & Chavakis, T. (2022). Fibrogenic Pathways in Metabolic Dysfunction Associated Fatty Liver Disease (MAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6996. <https://doi.org/10.3390/ijms23136996>
61. Tabibian, J. H., Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2013). Physiology of Cholangiocytes. In *Comprehensive Physiology* (s. 541–565). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120019>
62. Takahashi, Y. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2300. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2300>

63. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
64. Tsumoto, K., & Caaveiro, J. M. (2016). Antigen–Antibody Binding. In *eLS*(s.1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001117.pub3>
65. Van Herck, M., Vonghia, L., & Francque, S. (2017). Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients*, 9(10), 1072. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>
66. Venkatesh, S. K., & Torbenson, M. S. (2022). Liver fibrosis quantification. *Abdominal Radiology*, 47(3), 1032–1052. <https://doi.org/10.1007/s00261-021-03396-y>
67. Washington, K., Wright, K., Shyr, Y., Hunter, E. B., Olson, S., & Raiford, D. S. (2000). Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Human pathology*, 31(7), 822–828. <https://doi.org/10.1053/hupa.2000.8440>
68. web Animalab. (b.r.). *C57BL/6J mouse (JAX™)*. Získáno 29. březen 2023, z <https://animalab.eu/c57bl-6j-mouse-jax>
69. Yang, G., Velgos, S. N., Boddapati, S. P., & Sierks, M. R. (2014). Probing Antibody-Antigen Interactions. *Microbiology Spectrum*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0010-2013>
70. Zhang, C.-Y., Yuan, W.-G., He, P., Lei, J.-H., & Wang, C.-X. (2016). Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology*, 22(48), 10512. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i48.10512>