

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd



# Vliv diety na rozvoj jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy u myší

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Bc. Amálie Hemmerová

Hradec Králové; 2023

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem a nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá data, literaturu a ostatní zdroje, z nichž jsem informace čerpala, jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.“

V Hradci Králové 2023

.....

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D., vedoucí této diplomové práce, za odborné vedení a cenné rady, které mi byly velice nápomocny po čas zpracování této práce. Nadále chci poděkovat M. Sc. Samira Eissazadeh za skvělou atmosféru v laboratoři, za vedení průběhem experimentu, ale i za užitečné rady po něm. Oběma jsem z celého srdce vděčná.

Ráda bych sem také vepsala jedno nemalé poděkování, a to mé rodině a blízkým, kteří jsou tím hlavním podpůrným bodem pro získání mého vzdělání.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem nealkoholické steatohepatitidy (NASH), která je považována za velice závažné chronické jaterní onemocnění. Nealkoholická steatohepatitida je pokročilou formou NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) a je charakterizovaná přítomností jaterní steatózy a zánětu. NASH může být následována komplikacemi, jako je jaterní cirhóza nebo hepatocelulární karcinom.

Pro výzkum NASH je v první řadě třeba zvolit správný zvířecí model a dietu. V tomto směru se jeví velice účinným modelem pro studium NASH a hepatocelulárního karcinomu dietní model CDAA-HFD, který byl specifikován i v rámci této práce. Cílem této práce bylo sledovat vliv uvedeného dietního režimu na rozvoj jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy. Za tímto účelem byly sledovány vybrané parametry jaterní fibrózy u myší, kterým bylo uvedených dietním opatřením indukováno zmíněné poškození.

Do studie byli zařazeni 9týdenní myši samci kmene C57BL/6J, kteří byli rozdělení do dvou skupin: kontrolní skupina (n=6) se standardní laboratorní dietou (chow diet), druhá skupina (n=8) s CDAA-HFD dietou (choline-deficient L-amino acid defined high fat diet). U skupiny s CDAA-HFD dietou bylo navozeno fibrotické poškození tkáně, proto jsme mohli u této skupiny zaznamenat zvýšenou expresi námi testovaných proteinů: GFAP (glial fibrillary acidic protein),  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) a Mac-2 (galectin-3). Tyto markery jsme testovali pomocí metody western blot. Jaterní poškození bylo potvrzeno také zvýšenými biochemickými parametry ALT (alaninaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza) a celkového bilirubinu v krvi. Poměr hmotnosti jater/hmotnosti těla u jedinců v kontrolní skupině a CDAA-HFD skupině ukazoval na zřejmý vznik hepatomegalie u jedinců s CDAA-HFD dietou.

V této práci byl potvrzen vliv dietního režimu CDAA-HFD na rozvoj jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy s rozvinutou jaterní fibrózou u myšího modelu a vhodnost jeho využití pro další experimenty.

### KLÍČOVÁ SLOVA

NASH, jaterní fibróza, CDAA-HFD, western blot

## Abstract

This thesis deals with the study of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which is considered to be a very serious chronic liver disease. Non-alcoholic steatohepatitis is an advanced form of NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) and is characterized by the presence of hepatic steatosis and inflammation. NASH can be followed by complications such as liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma.

For NASH research, the first thing to do is to choose the right animal model and diet. In this regard, the CDAA-HFD dietary model, which was also specified in this work, appears to be a very effective model for the study of NASH and hepatocellular carcinoma. The aim of the present study was to investigate the effect of that dietary regimen on the development of hepatic damage of the character of non-alcoholic steatohepatitis. For this purpose, selected parameters of liver fibrosis were monitored in mice in which the mentioned damage was induced by the dietary regimen.

The study included 9-week-old male mice of the C57BL/6J strain, which were divided into two groups: a control group (n=6) with a standard laboratory diet (chow diet), the other group (n=8) with a CDAA-HFD diet (choline-deficient L-amino acid defined high fat diet). Fibrotic tissue damage was induced in the CDAA-HFD diet group, therefore we could observe increased expression of our tested proteins: GFAP (glial fibrillary acidic protein),  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) and Mac-2 (galectin 3). These markers were tested by western blot. Liver damage was also confirmed by elevated biochemical parameters ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase) and total bilirubin in the blood. The liver weight/body weight ratio of subjects in the control group and the CDAA HFD group indicated an apparent development of hepatomegaly in mice on the CDAA-HFD diet.

In the present study, the effect of CDAA HFD diet on the development of liver damage of the character of non-alcoholic steatohepatitis with developed liver fibrosis in a mouse model was confirmed and its suitability for further experiments was confirmed.

### KEYWORDS

NASH, liver fibrosis, CDAA-HFD, western blot

## OBSAH

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
1. ÚVOD .....	7
2. CÍL .....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1. Játra .....	10
3.1.1. Anatomie jater.....	10
3.1.2. Morfologie jaterního lalůčku .....	11
3.1.3. Funkce jater .....	12
3.2. Nealkoholická steatohepatitida (NASH) .....	15
3.3. Proteiny charakterizující jaterní fibrózu .....	19
3.3.1. Fibróza jaterní tkáně.....	19
3.3.2. GFAP .....	21
3.3.3. $\alpha$ -SMA.....	23
3.3.4. Mac-2 (Galectin-3).....	25
3.4. Zvířecí model .....	28
3.4.1. Standardní dietní model („chow diet“) .....	28
3.4.2. CDAA-HFD dietní model .....	29
3.5. Western blot.....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
4.1. Experimentální zvířata.....	33
4.2. Biochemická analýza .....	34
4.3. Postup práce pro metodu western blot .....	36
4.3.1. Homogenizace tkání, izolace proteinů a stanovení koncentrace.....	36
4.3.2. Metoda western blot.....	36
4.3.2.1. Příprava gelu.....	36
4.3.2.2. Příprava vzorků.....	38
4.3.2.3. Gelová elektroforéza .....	38
4.3.2.4. Blotování mokrou cestou .....	39
4.3.2.5. Aplikace protilátek.....	40
4.3.3. Chemiluminiscenční analýza .....	42
4.4. Statistická analýza .....	43
5. VÝSLEDKY.....	44
5.1. Vliv diety na rozvoj hepatomegalie .....	44
5.2. Vliv diety na rozvoj jaterního poškození .....	45

5.3. Vliv diety na rozvoj jaterní fibrózy.....	47
6. DISKUZE .....	49
7. ZÁVĚR .....	52
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	53
SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	55
SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK.....	56
SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ .....	57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	58

## 1. ÚVOD

Játra jsou považována za jeden z největších orgánů v lidském těle. Nespočet jeho důležitých funkcí klasifikuje tento orgán jako pro tělo nepostradatelný (Horák, 2014). Chronická onemocnění jater jsou jednou z hlavních příčin nemoci a úmrtnosti po celém světě. Obvykle se onemocnění rozvíjí po dobu několika let a snadno progreduje do závažnějších forem, protože úvodní stádia poškození neprovázejí významné symptomy (Karanjia, 2016).

NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) je velkým zdravotním problémem, který zahrnuje hned několik onemocnění jater, od prosté steatózy po nealkoholickou steatohepatitidu, a může vyústit až v cirhózu či hepatocelulární karcinom. Prevalence se v dospělé populaci ve vyspělých zemích pohybuje mezi 17-46 %, v evropské populaci okolo 25 %. NAFLD lze považovat za manifestaci metabolického syndromu, neboť je výskyt tohoto chronického onemocnění často úzce spjat se stavy, jako je diabetes mellitus II. typu a obezita, zejména obezita viscerálního typu (Brůha, 2019).

Za pokročilou/aktivní formu NAFLD se považuje NASH (nealkoholická steatohepatitida) a liší se od prosté steatózy přítomností zánětu. V klinické praxi se často uvádí společně s ostatními svými projevy (prostá steatóza, fibróza, cirhóza, popř. i hepatocelulární karcinom) pod názvem NAFLD/NASH (Ehrmann, 2017).

Udává se, že hlavní příčinou mortality v populaci nemocných s NAFLD/NASH jsou kardiovaskulární onemocnění a malignity. NAFLD je obecně prozánětlivým stavem. Jeho působení souvisí s nárůstem prozánětlivých mediátorů, oxidačním stresem, uvolňováním lipotoxických metabolitů, inzulinovou rezistencí a s tím spojenou nadprodukcí inzulinu a hyperglykemií, s dyslipidemií a nárůstem karcinogenních růstových faktorů. Není divu, že v důsledku kombinace všech těchto pochodů dochází ke vzniku mnoha mimojaterních projevů NAFLD. Kromě kardiovaskulárních potíží se k mimojaterním projevům řadí například onemocnění ledvin, osteoporóza a kolorektální karcinom (Ehrmann, 2017).

Pro prognózu pacienta je zcela zásadní přítomnost NASH. Má-li pacient diagnostikován metabolický syndrom, je žádoucí u něj pátrat také po známkách jaterního poškození. Naopak u pacientů s náhodně zjištěnou steatózou je logické provést screening kardiovaskulárních onemocnění a poruch metabolismu glukózy (Brůha, 2019).



Určit jaterní steatózu lze celkem snadno běžnými zobrazovacími technikami. Naproti tomu, stanovit konečnou diagnózu NASH lze pouze histologicky, a proto je mnohem obtížnější stanovit také její přesnou prevalenci. V evropské populaci by se měla prevalence pravděpodobně pohybovat okolo 1,5-6,5 % (Brůha, 2019). Jaterní biopsie je však velice invazivní zákrok, proto je tendence hledat další spolehlivé biomarkery, které by dokázaly účinně predikovat NASH (Kiyooki, 2022).

## 2. CÍL

Cílem této práce bylo sledovat vliv nastaveného dietního režimu (CDAA-HFD) na rozvoj jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy (NASH). Za tímto účelem byly sledovány vybrané markery jaterní fibrózy a další jaterní parametry u myší, kterým bylo uvedených dietním opatřením indukováno jaterní poškození.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Játra

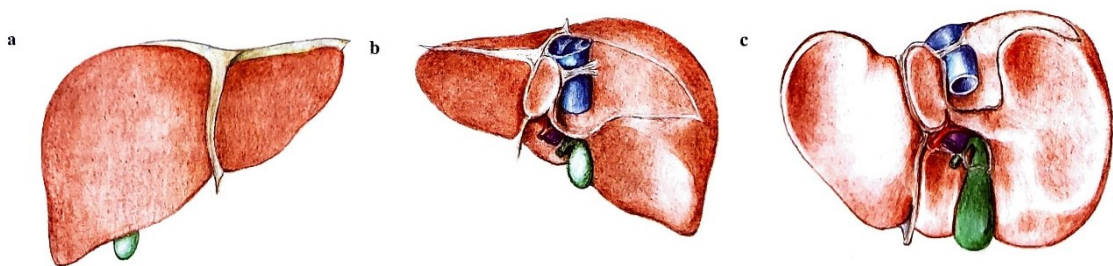
Játra jsou řazena mezi největší orgány v lidském těle. Jsou nepárovým orgánem klínovitého tvaru (Horák, 2014) uloženým intraperitoneálně s úzkou vazbou na bránici (Ehrmann, 2010).

U dospělého člověka představují přibližně 2,5 % hmotnosti těla, u novorozence 4 %. Játra jsou hnědočervená, na pohmat měkká a poddajná, zároveň ale velice křehká, a jsou tudíž náchylná na závažné úrazy spojené s masivním a život ohrožujícím krvácením (Čihák, 2004).

#### 3.1.1. Anatomie jater

Horní, přední a zadní plocha jater přiléhá k bránici (Obr. 1a, b), boční část je orientovaná na pravou stěnu břišní a dolní plocha naléhá na orgány v dutině břišní, které tvarují tento povrch do určitého reliéfu (Obr. 1c) (Ehrmann, 2010).

Tradičně jsou játra dělena asymetricky na pravý a levý lalok. Tímto způsobem je člení úzký pruh *ligamentum falciforme*. Dále rozeznáváme dva menší laloky, *lobus quadratus* a *lobus caudatus* členěné širším vazivovým pruhem *ligamentum hepatoduodenale*. Jaterní konec tohoto ligamenta se nazývá *porta hepatis* a je místem vstupu a výstupu cév, nervů a žlučovodu, čímž zajišťuje spojení mezi játry a trávicím traktem (Ehrmann, 2010).



**Obrázek 1 Makroskopický obraz jater** (převzato a upraveno z: Ehrmann, 2010; str. 17).

*Facies diaphragmatica* (a, b), *facies visceralis* (c).

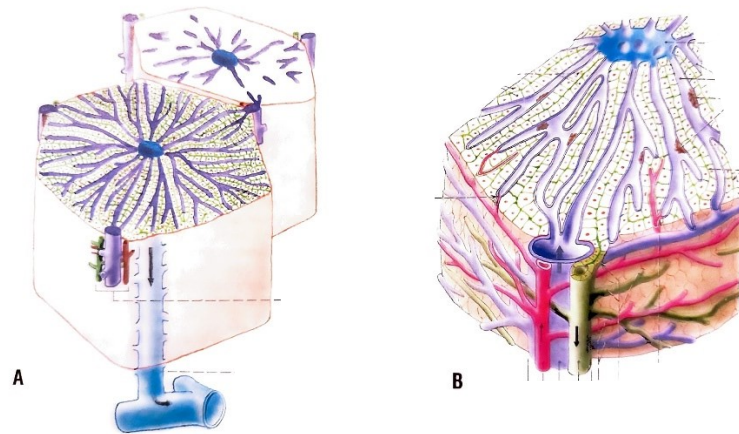
Při průtoku krve játry se uplatňují dvě hlavní složky: funkční a nutritivní. Složku funkční představuje krev bohatá na látky určená k jaternímu zpracování, kterou přivádí z velké části trávicího traktu *vena portae*. Ta ji sbírá z větví všech nepárových orgánů dutiny břišní (tj. stěny

žaludku, střev, pankreatu a sleziny). Nutritivní složku s okysličenou krví přivádí *arteria hepatica*. Tato krev vyživuje žlučové cesty, stěny velkých žil a vazivo, na výživě jaterní buňky se však podílí minimálně (Belovičová, 2015; Čihák, 2004). Odkysličená krev je poté z jater odváděna jaterními žilami do *vena cava inferior* a ta ji vrací do srdce (Belovičová, 2015).

Každý z obou jaterních laloků má jeden hlavní žlučovod, který vznikl spojením žlučových kanálků a jímž se odvádí játry vytvořená žluč. Spojením pravého a levého žlučovodu vznikne *ductus choledochus* (Belovičová, 2015).

### 3.1.2. Morfologie jaterního lalůčku

Z morfologického pohledu jsou játra tvořena jaterními lalůčky (*lobuli venae centrales*) (Obr. 2 A). Je to část jaterní tkáně, která má na histologickém řezu šestiúhelníkový tvar (Bureš, 2014). Středem lalůčku probíhá centrální žíla (*vena centralis*) a při okraji, resp. každém ze šesti rohů, nacházíme tzv. portobiliární prostory (Obr. 2 B). Portobiliárním prostorem prochází větve jaterní tepny, portální žíly a žlučovod, někdy jim dohromady říkáme portální triáda. Jaterní tepna a jaterní žíla se spojí a jako jaterní sinusoida směřují k centrální žíle (Horák, 2014).



**Obrázek 2 Schéma stavby jaterního lalůčku** (převzato a upraveno z: Čihák, 2004; str. 134).

Celkový pohled na strukturu (A), detail stavby (B).

Uvnitř sinusoidů se vyskytují Kupfferovy buňky, které díky své makrofágové aktivitě z portální krve vycytávají antigeny, endotoxiny, bakterie (Horák, 2014), cizorodé bílkoviny i přestálé erythrocyty (Bureš, 2014). Kromě toho jsou schopné produkovat signální molekuly (interferony, interleukiny, tumor nekrotizující faktor), a zajišťovat tím intercelulární komunikaci (Lata, 2005). Kupfferovy buňky tvoří 25-30 % jaterních buněk (Bureš, 2014).

V Disseho prostoru (tj. prostor mezi stěnou sinusoidy a buňkou hepatocytu) se nacházejí hvězdčité buňky (také Itovy buňky). Jsou charakteristické dlouhými výběžky, kterými obepínají sinusoidy a pronikají až mezi hepatocyty. Při chronických poruchách jater se mění na myofibroblasty, které obsahují kontraktilní elementy. Mohou tak měnit průsvit sinusoidů, produkovat mezibuněčnou hmotu a kolagen a při dlouhodobé stimulaci podněcovat vznik fibrózy jaterní tkáně (Horák, 2014).

### 3.1.3. Funkce jater

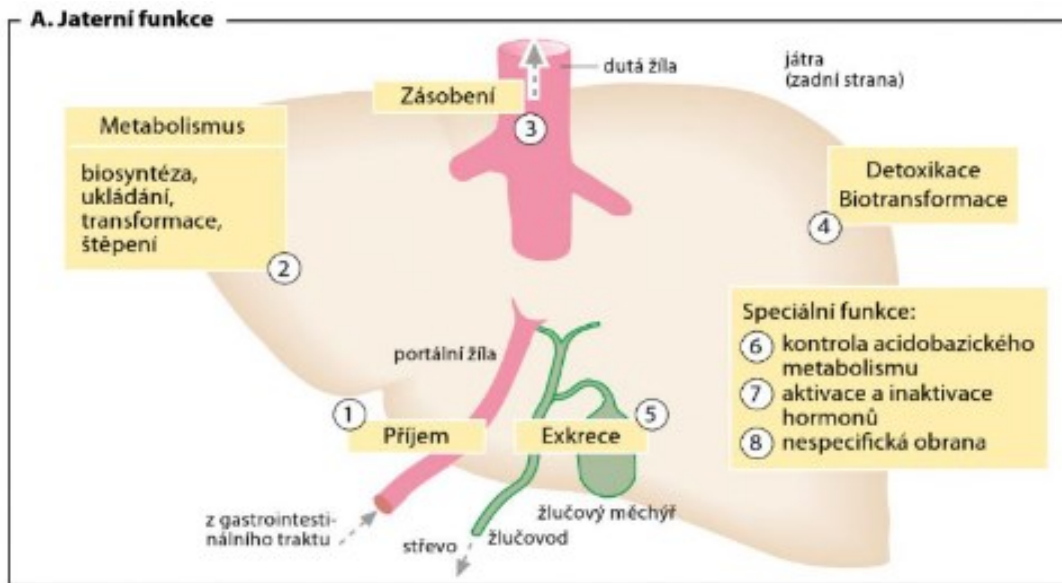
Během embryonálního vývoje jsou játra místem krvetvorby. To způsobí, že od 10. týdne do konce 7. měsíce tvoří tento orgán až 10 % hmotnosti plodu. Krvetvorby poté ubývá a při narození dítěte tvoří játra už jen 4-5 % hmotnosti těla (Čihák, 2004).

Játra mají vysokou metabolickou aktivitu a zpracovávají množství látek přicházejících z *vena portae* a systémovou cirkulací. Mohou to být látky jak endogenního (bilirubin, žlučové kyseliny aj.), tak i exogenního původu (toxiny, xenobiotika aj.) (Ehrmann, 2010).

Hepatocyty tvoří přibližně 80 % hmoty jater a jsou po celou dobu v těsném kontaktu s krví. Na základě své lokalizace podél sinusoidů, odlišujeme hepatocyty periportální a perivenózní. Díky tomu mají jaterní buňky různé metabolické funkce a tvoří tzv. metabolické zóny (Obr. 3) (Koolman, 2012).

Hlavním úkolem jater v metabolismu sacharidů, je udržet hladinu glykémie v normě. Tuto rovnováhu udržují tvorbou glykogenu/uvolňováním glukózy (Lukáš, 2007). Vysoká hladina glukózy zapříčiní tvorbu a uskladnění glykogenu, glykolýzu a lipogenezi. V případě nízké glykémie, je normální hladina glukózy v krvi játry doplněna glykogenolýzou (Lata, 2005). Případný nedostatek glykogenu nahradí glukoneogeneze, při které se tvoří glukóza z kyseliny mléčné, z glycerolu, při štěpení tuků, nebo dokonce z některých aminokyselin (Lukáš, 2007).

Oxidace mastných kyselin je zdrojem energie pro činnost jater. Probíhá zde také tvorba lipoproteinů, syntéza cholesterolu, žlučových kyselin, fosfolipidů a přeměna glukózy a aminokyselin na mastné kyseliny (Lukáš, 2007).

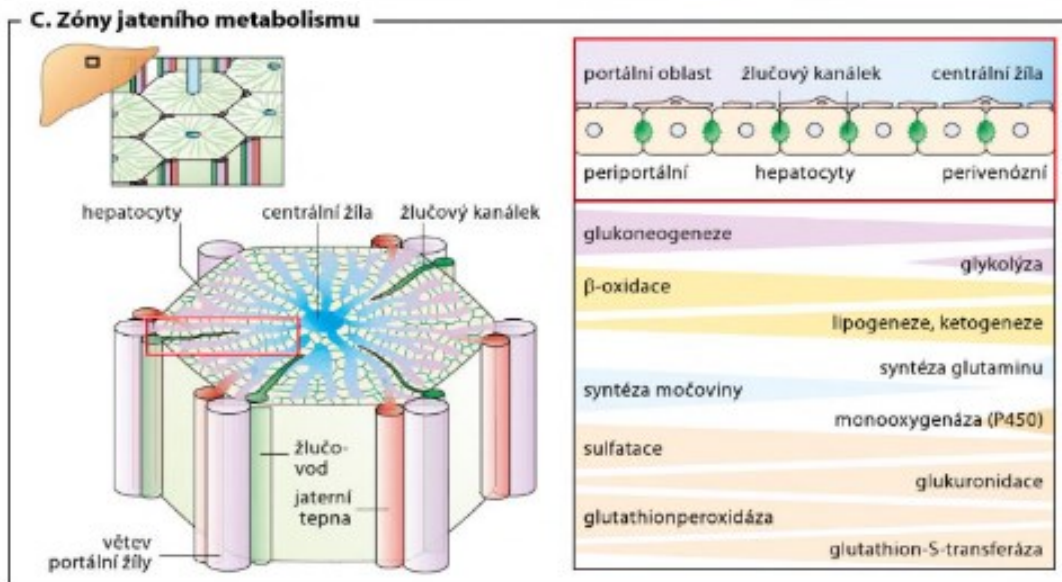


### B. Jaterní metabolismus

Metabolismus sacharidů	Metabolismus lipidů	Metabolismus aminokyselin	Biotransformace
glukóza BUR	mastné kyseliny BR	aminokyseliny BR	steroidní hormony ER
galaktóza R	tuky BR	močovina B	žlučová barviva ER
fruktóza R	ketolátky B		etanol R
manóza R	cholesterol BER		farmaka ER
pentózy BR	žlučové kyseliny BE		
laktát R	vitamíny UR		
glycerol BR			
glykogen BUR			

Plazmatické proteiny	Legenda
lipoproteiny BR	B biosyntéza
albumin BR	E exkrece
koagulační faktory BR	U ukládání
hormony BR	R transformace a rozklad
enzymy BR	



**Obrázek 3** Funkce jater (převzato z: Koolman, 2012; str. 315).

Jaterní funkce (A), typy metabolismu (B), metabolické zóny (C).

Významnou funkcí jater je tvorba žluči. Žlučové kyseliny, potřebné pro její tvorbu, jsou dvojího typu: primární a sekundární. Primární žlučové kyseliny (kyselina cholová a chenodeoxycholová) jsou syntetizované *de novo* z cholesterolu, zatímco sekundární žlučové kyseliny (kyselina deoxycholová a lithocholová) jsou původem z enterohepatálního oběhu. Žluč je důležitá pro trávení, protože způsobuje emulgaci tuků. Povrch tuků zvětší pro působení pankreatické lipázy, a umožní tak jejich snadnější vstřebávání. Je také hlavním prostředkem v těle pro odstranění cholesterolu a některých látek (bilirubin, proteiny krevní plazmy) (Mareš, 2013). Bilirubin přichází do jater ve vazbě na albumin. Z této vazby je nejprve rozvolněn a teprve poté je vyloučen spolu se žlučí (Langmeier, 2009).

V játrech dále probíhá deaminace aminokyselin a syntéza plazmatických proteinů (kromě imunoglobulinů) a proteinů akutní fáze (Lukáš, 2007). Většina plazmatických proteinů se v játrech nejen syntetizuje, ale i rozkládá (Koolman, 2012). Deaminací aminokyselin vzniká amoniak, který se v ornitinovém cyklu mění v močovinu, a je tak z jater účinně eliminován. Eliminace amoniaku je potřebná pro udržení acidobazické rovnováhy. Neschopnost jater odstranit amoniak může vést ke vzniku jaterní encefalopatie (Lata, 2005).

Co se týče detoxifikační funkce jater, hraje zde svoji roli enzymatický systém (nejzásadnější pozici zaujímá cytochrom P-450) a schopnost Kupfferových buněk fagocytovat. Játra tak mohou zneškodnit přítomné mikroorganismy, ale i některé léky a exogenní látky (Lukáš, 2007). Obvykle se jedná o lipofilní látky a jsou odstraněny spolu se žlučí (Lata, 2005).

Kromě glykogenu jsou játry ukládány i další látky: energetické rezervy, stavební látky, minerály, stopové prvky (železo, měď, kobalt), některé vitamíny (vitamín A, D, K, kyselina listová a B12) (Langmeier, 2009; Koolman, 2012) a celá řada hormonů. Hormony jsou zde nejen skladovány, ale mohou být v játrech i degradovány a aktivovány (např. aktivace inzulinu) (Lata, 2005).

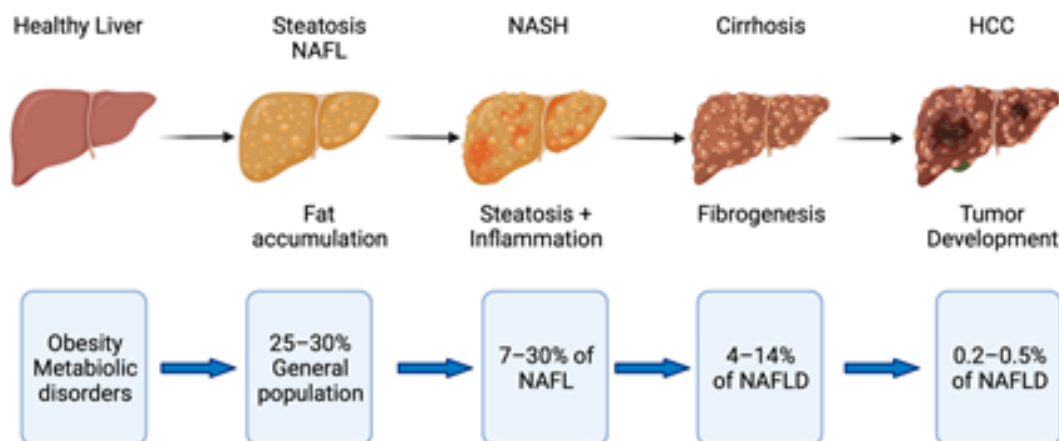
Játra jsou také důležitým orgánem hemostázy. Zajišťují tvorbu fibrinogenu a plazmatických srážecích faktorů. Z toho důvodu jsou některá jaterní onemocnění často propojena i s poruchami hemokoagulace (Langmeier, 2009).

A v neposlední řadě mají játra schopnost termoregulace. Během metabolických procesů a v závislosti na jejich intenzitě se uvolňuje množství tepla, které ohřívá krev protékající tímto orgánem (Lukáš, 2007).

### 3.2. Nealkoholická steatohepatitida (NASH)

Nealkoholové postižení jater (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) je celosvětově jednou z nejčastějších příčin chronického onemocnění jater a trpí jí 25 % dospělé populace (Kiyooki, 2022). NAFLD je považované za jaterní manifestaci metabolického syndromu, je úzce spjata s diabetes mellitus 2. typu, obezitou a arteriální hypertenzí (Brůha, 2019) a je bráno jako další z mnoha rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění (Kiyooki, 2022).

NAFLD představuje široké spektrum jaterních postižení. Zahrnuje prostou steatózu, nealkoholickou steatohepatitidu (NASH, non-alcoholic steatohepatitis), různé stupně fibrózy až po cirhózu (Obr. 4) a všechny přidružené komplikace, kterými jsou portální hypertenze a hepatocelulární karcinom (Brůha, 2019). Příčinou vzniku NAFLD je nerovnováha mezi příjmem a výdejem jaterních lipidů a vznikající steatóza se později stává patologickým předpokladem a základem jeho progresu (Wang, 2020).



**Obrázek 4** Progrese NAFLD (převzato z: Engelman, 2022).

Ve zdravých játrech (healthy liver) dochází vlivem obezity (obesity) a jiných metabolických onemocnění (metabolic disorders) k akumulaci tuku, a tím ke ztučnění jater, tj. steatóze (steatosis), někdy označované jako NAFL (non-alcoholic fatty liver, nealkoholické ztučnění jater). Pokud se kromě steatózy v játrech rozvine také zánět (inflammation), dochází k rozvoji NASH (nonalcoholic steatohepatitis, nealkoholická steatohepatitida). Postupující jaterní fibrogenese (fibrogenesis) může přejít v cirhózu (cirrhosis), případně až v rozvoj tumoru (tumor development) a vznik HCC (hepatocellular carcinoma, hepatocelulární karcinom). Obecně taková jaterní poškození označujeme jako NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease, nealkoholické tukové postižení jater). General population (běžná populace).



Přibližně u 10 % případů NAFLD dochází k progresi do NASH (Kiyooki, 2022). NASH patří k nejčastějším jaterním onemocněním (Bureš, 2003). Je brána jako pokročilá/aktivní forma NAFLD a od prosté steatózy se liší přítomností lobulárního zánětu a perivaskulární a portální fibrózy (Ehrmann, 2017).

Vážnost NASH tkví v jejím riziku progresu do jaterní cirhózy (Bureš, 2003). Až 20 % případů může progredovat do cirhózy jaterní tkáně a do hepatocelulárního karcinomu (Kiyooki, 2022). Je hlavní příčinou tzv. non-B a non-C rakoviny jater a její prevalence stoupá zejména s nárůstem mezi jednotlivci s nemocemi spojenými s nezdravým životním stylem (Nagaoka, 2021).

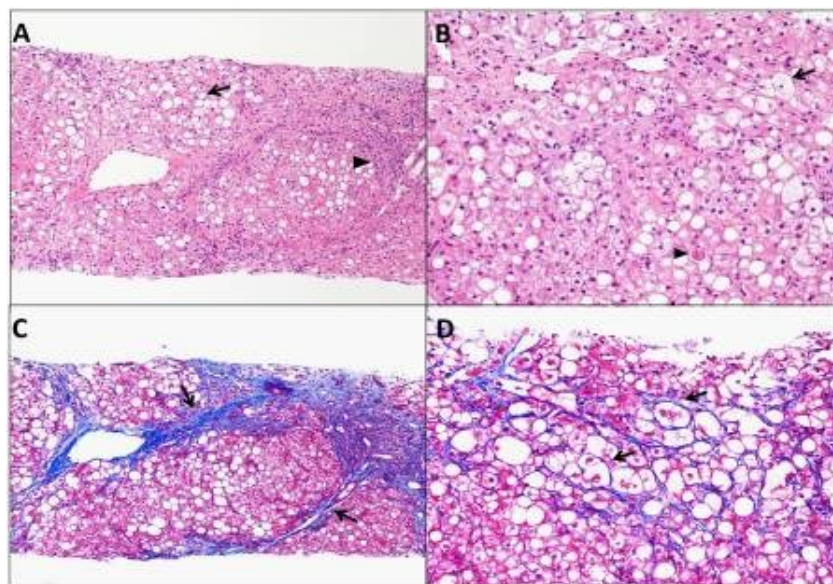
Rizikovými faktory pro vznik a progresi NASH jsou metabolické poruchy vrozené (Wilsonova choroba, abetalipoproteinémie a jiné) i získané (obezita, diabetes mellitus, metabolický syndrom, idiopatické střevní záněty a další). Dalšími rizikovými faktory jsou některé toxiny a léky (tetracykliny, kortikosteroidy, warfarin a mnoho dalších) (Bureš, 2003).

Patogeneze NASH není příliš objasněna, pouze se předpokládá existence mnoha faktorů podporujících zánět jater (Kiyooki, 2022). Ve většině zdrojů se uvádí tzv. hypotéza dvojitého poškození (tzv. two-hit hypothesis). Prvním krokem jsou důsledky inzulínové rezistence. Při obezitě vzniká nerovnováha mezi příjmem volných mastných kyselin a eliminací triacylglycerolů. Ve chvíli, kdy je překročena metabolická kapacita jater, dochází ke kumulaci tuku v hepatocytech, které se této změně přizpůsobí, a následuje rozvoj jaterní steatózy (Bureš, 2014; Bureš, 2003; Ehrmann 2017). V druhém kroku dochází k poškození hepatocytů a vzniku zánětlivé komponenty. Hrají zde roli vedlejší produkty a meziprodukty metabolismu mastných kyselin, oxidační stres vznikající zvýšenou oxidací mastných kyselin, cytokiny, bakteriální toxiny a genetická predispozice (modifikace genu PNPLA3, patatin-like phospholipase domain containing protein 3, je spjata se zvýšenou akumulací tuku, a to pouze v játrech) (Brůha, 2019).

Onemocnění je u třetiny osob pouze asymptomatické a u zbytku provázeno hlavně nadměrnou únavou. Zároveň u přibližně poloviny případů byla popsána necharakteristická dyspepsie (Bureš, 2003). Pacienti mohou být dále provázeni mnoha nespecifickými příznaky, jako je malátnost a tlak v pravém horním kvadrantu. Příčinou nemoci a úmrtnosti bývají kardiovaskulární problémy (Hulín, 2020).

Ultrazvukové vyšetření ukazuje hepatomegalii (asi 75 % pacientů s NAFLD) (Brůha, 2019), játra jsou světlá. CT (computed tomografy) ani magnetická rezonance již nepřináší žádné jiné nálezy (Bureš, 2014). Laboratorní vyšetření nachází vysokou (až pětikrát vyšší) aktivitu aminotransferáz, v pokročilém stádiu také vysoké hladiny alkalické fosfatázy a bilirubinu a nízké hodnoty albuminu (Bureš, 2003). Diferenciální diagnostika NASH je určena k jejímu odlišení od alkoholické steatohepatitidy (Bureš, 2014).

Jaterní biopsie je zlatým standardem pro diagnostiku NASH, je však limitována komplikacemi při zákroku, chybou při odběru vzorků a vysokou cenou (Kiyooki, 2022). Nicméně pro určení konečné diagnózy je rozhodující. V histologickém vyšetření (Obr. 5) potom nacházíme jaterní steatózu, balónovou degeneraci hepatocytů, difúzní lobulární smíšený akutní nebo chronický zánětlivý infiltrát a perivaskulární a perisinusoidální depozita kolagenu. Neméně častým nálezem může být i Malloryho hyalin, vakuolizace jader periportálních hepatocytů, lobulární lipogranulomatóza, Kupfferovy buňky PAS rezistentní a pericelulární fibróza. V pokročilé fázi onemocnění lze zaznamenat portální fibrózu. Portální zánětlivá reakce bývá výraznější u dětí (Bureš, 2014). V biopsii je často přítomna hemosideróza (Lukáš, 2007).



**Obrázek 5** Histologické řezy jaterní biopsie pacienta s NASH (převzato z: Ibrahim, 2016).

Steatóza (šipka) s cirhotickým uzlem a infiltrací zánětlivých buněk (hlavička šipky) barvena hematoxylinem a eosinem (H&E) a zvětšena 10x (A), balónové hepatocyty (šipka) s acidofilním tělem (hlavička šipky) barveny H&E a zvětšeny 20x (B), „přemostující“ fibróza s cirhotickým uzlem barvena trichromem a zvětšena 10x (C), pericelulární fibróza barvena trichromem a zvětšena 20x (D).

Jaterní fibróza je zaznamenána u 15-50 % pacientů, cirhóza u 7-16 % (Bureš, 2003). Horší prognóza se týká spíše starších (nad 60 let) a obézních osob a osob s inzulinovou rezistencí, nebo již rozvinutou jaterní cirhózou. V porovnání s běžnou mortalitou v populaci je úmrtnost na NASH dvakrát vyšší (Bureš, 2014). Nižší míra prevalence NAFLD se týká žen v reprodukčním věku, tato skutečnost se však mění po menopauze a ženy středního věku tak mají stejnou nebo až vyšší míru prevalence než muži stejného věku. Zároveň studie poukazují na přítomnost těžší formy jaterní fibrózy u těchto žen v porovnání se ženami v reprodukčním věku (DiStefano, 2020).

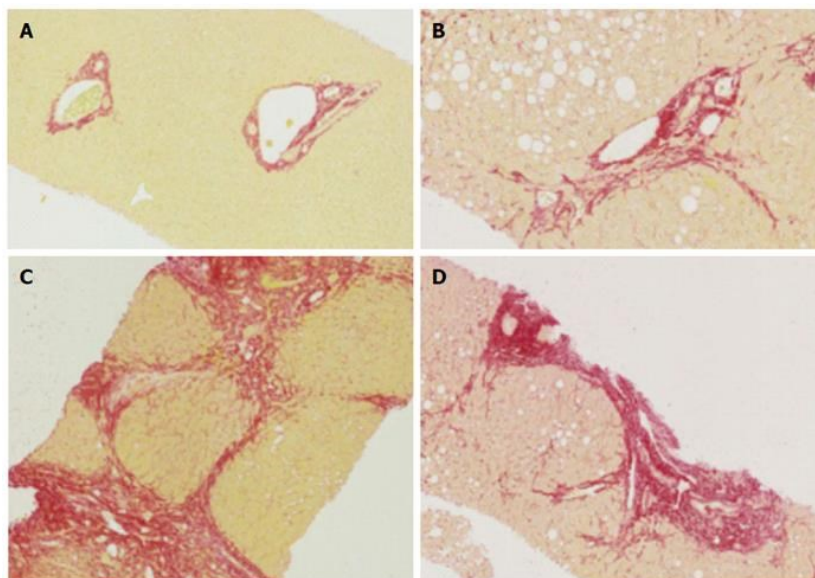
Dosud neexistuje žádná účinná terapie, nicméně jsou pacientům alespoň doporučena některá důležitá režimová opatření. Jsou jimi redukce hmotnosti (u obézních) alespoň o 7-10 %, abstinence a suplementace vitaminy C a E (Bureš, 2014; Ehrmann, 2017). U metabolických poruch je doporučena kromě redukce nadváhy také kompenzace diabetu, léčba hypertenze a případná léčba dyslipoproteinémie (Bureš, 2003; Ehrmann, 2017).

### 3.3. Proteiny charakterizující jaterní fibrózu

#### 3.3.1. Fibróza jaterní tkáně

Fibrózou rozumíme strukturální změny jaterní tkáně vznikající v důsledku nadměrného ukládání vazivové hmoty. Tvorbu extracelulární matrix jako odpověď na poškození tkáně nazýváme fibrogenese. Tvorba matrix je důležitá pro hojivé procesy ve tkáni. Fibrolýzou potom nazýváme odbourání matrix ve chvíli, kdy byly hojivé procesy ukončeny (Špičák, 2008).

Fibróza je dynamický proces, který za jistých okolností může vést k nadměrnému ukládání extracelulární matrix. Spočívá v narušení regulace mechanismů, které udržují funkčnost jater v rovnováze. Je odpovědí tkáně nikoli na krátkodobé a časově omezené poškození, ale na poškození chronické. Fibrózu lze vnímat jako formu aktivního hojení tkáně a v případě zhojení je tento proces reverzibilní. Tím se liší od cirhózy, kterou považujeme za konečné a již nevratné stádium fibrotizace s narušením jaterních funkcí. Fibrotizace ve stádiu cirhózy je spojena se vznikem vazivových sept, které spolu s uzlovitou regenerací parenchymu působí destrukci architektury jater (Špičák, 2008) (Obr. 6).

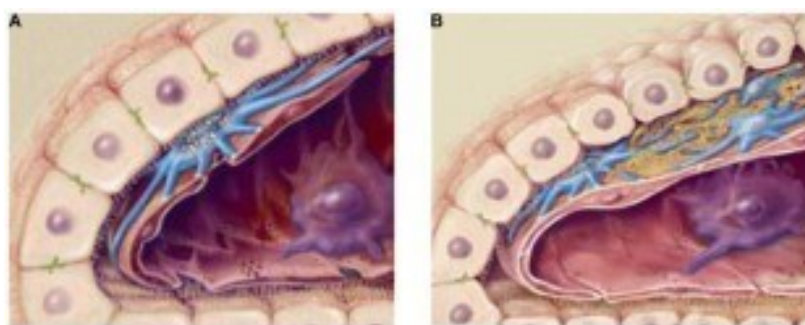


**Obrázek 6** Histologie zdravé, fibrotické a cirhotické jaterní tkáně (převzato z: Karanjia, 2016).

Zdravá tkáň (A), mírná až střední fibróza (B), střední „přemostující“ fibróza (C), cirhóza (D); barvené saturnovou červení.

Fibróza je důsledkem chronického poškození jater různé etiologie (Kisseleva, 2017), např. poškození jater alkoholem, poškození u nealkoholické steatohepatitidy,

hemochromatózy, Buddyho-Chiariho syndromu a při chronickém městnání. Hlavní roli v rozvoji fibrózy mají hvězdicovité buňky (viz GFAP). Ty tvoří 5-8 % jaterních buněk a jsou hlavním zdrojem extracelulární matrix ve zdravé i poškozené tkáni. Hvězdicovité buňky se aktivují a mění ve fibrogenní buňky podobné myofibroblastům (viz  $\alpha$ -SMA). Aktivují je poškozené hepatocyty (uvolňují hlavní fibrogenní cytokin TGF- $\beta$ -1), poškozené biliární buňky (vliv TNF- $\alpha$ , endotelinu-1 a PDGF), endotelové buňky (produkce fibronektinu), Kupfferovy buňky (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , reaktivní kyslíkové radikály, TNF- $\alpha$  a MMP-9) a další faktory (Špičák, 2008; Lurie, 2015).



**Obrázek 7 Hvězdicovité buňky** (převzato z: Friedman, 2004).

*Klidová fáze (A), aktivované hvězdicovité buňky (B).*

Extracelulární matrix se skládá především z fibrilárního kolagenu typu I a III, méně potom z kolagenů typu IV, V a VI, z nekolagenních glykoproteinů (laminin, fibronektin), proteoglykanů, glykosaminoglykanů (chondroitin sulfát, dermatan sulfát, kyselina hyaluronová). Za fyziologických podmínek je poměr kolagenů I a III vyrovnaný, během jaterního poškození se však poměr těchto kolagenů mění. Výsledkem produkce těchto látek je vznik fibril v Disseho prostoru (Šmíd, 2020).

Mezi zdroje myofibroblastů se kromě hvězdicovitých buněk dále uvádí epiteliální buňky, mezenchymální kmenové buňky, fibrocyty, mezoteliální buňky a portální fibroblasty (Kisseleva, 2017). Během fyziologické opravy tkáně, je aktivace myofibroblastů pouze dočasná. Naopak při jejich dlouhotrvající aktivaci dochází k akumulaci extracelulární matrix a vzniku vláknité jizvy. Nejpoužívanějším markerem myofibroblastů je  $\alpha$ -SMA, dále to také mohou být F-aktin, vinkulin a fibronektin, a dále vimentin a desmin (Kisseleva, 2017; Koga, 2019).

### 3.3.2. GFAP

Hlavními stavebními kameny buněčného cytoskeletu jsou tzv. filamenta, která podle jejich průměru dělíme na tři typy: mikrofilamenta (také aktinová filamenta; 7 nm), intermediární filamenta (10 nm) a mikrotubuly (25 nm). Filamenta (spolu s doprovodnými proteiny) uvnitř buňky zajišťují mechanickou stabilizaci, pohyby buňky a pohyby uvnitř buňky. Mezi intermediální filamenta patří i skupina gliových filament, která lze najít v astrocytech, ve Schwannových buňkách v periferním nervovém systému (tj. PNS) a enterických gliových buňkách jako součást enterického nervového systému (tj. ENS). Všechna filamenta jsou obecně výsledkem polymerace proteinů a gliová filamenta jsou tvořena GFAP, tj. gliovým vláknitým kyselým proteinem (glial fibrillary acidic protein) (Lüllmann-Rauch, 2012; Yang, 2015).

Gliální fibrilární kyselý protein je monomerní, relativně nerozpustný intermediární filamentový protein produkovaný zejména v astrocytech (Valihrach, 2021; Sun, 2021; Petzold, 2015). V elektronovém mikroskopu GFAP vypadá jako propletená vlákna s průměrem 8-12 nm (Petzold, 2015). Struktura GFAP- $\alpha$ , nejhojnější isoformy, je tvořena hlavní spirálovou doménou následovanou 4 dalšími doménami opět spirálové struktury, které jsou lemované 3 oblastmi linkeru. Monomerní struktura GFAP přechází do vláknité formy nejprve tvorbou paralelního dimeru, poté antiparalelního tetrameru, následně oktameru atd. (Yang, 2015).

GFAP (zejména jeho  $\alpha$ -isoforma) je hlavní složkou cytoskeletu astrocytů, a je tak nezbytný pro udržení jejich struktury a tvaru. Díky rychlým změnám v sestavování a polymeraci má vysoce morfologickou plasticitu. Tato vlastnost dává astrocytům funkci fyzické bariéry mezi neurony a stabilizace extracelulárního prostředí. GFAP také může zprostředkovávat přímou interakci mezi molekulami nebo být vodičkem pro transport proteinů v astrocytech (Li, 2020). Eliminace GFAP vede ke snížení odolnosti tkáně vůči mechanickému namáhání, zatímco jeho nadměrná exprese vede k encefalopatii (Hol, 2015).

GFAP je kódován jediným genem umístěným na chromozomu 17q21. Existuje 10 isoform: GFAP- $\alpha$  (isoforma 1; zejména mozek a mícha, ale i v PNS), GFAP- $\beta$  (Schwannovy buňky v PNS; indukovaná po poškození nervů), GFAP- $\gamma$  (*corpus callosum*, kostní dřev a slezina), GFAP- $\delta$  (GFAP- $\epsilon$ , isoforma 2; astrocyty v subventrikulární zóně), GFAP- $\kappa$  (isoforma 3), GFAP- $\zeta$

a zbylé čtyři isoformy souhrnně označované jako GFAP-1+ (jedná se o varianty vzniklé posunem nukleotidového rámce; astrocyty) (Yang, 2015).

Exprese GFAP je regulována hormony jaderných receptorů, růstovými hormony a lipopolysacharidy. Mutace GFAP tíhnou ke vzniku proteinových depozit pojmenovaných Rosenthalova vlákna, která se vyskytují u Alexandrovy choroby (Yang, 2015).

Astrocyty tvoří největší část buněk lidského centrálního nervového systému a jsou nepostradatelné pro správný vývoj mozku. Neurologické poruchy jsou provázené rozkladem astrocytů a uvolněním GFAP do krevního řečiště. Proto by zvýšení hladin tohoto proteinu a produktů jeho rozpadu (GFAP-BDPs, GFAP breakdown products) v séru mohlo sloužit jako marker pro stanovení časně diagnózy některých neurologických poruch, včetně gliomů (Heimfarth, 2022; Hol, 2015; Yang, 2015). Výhodou GFAP jako markeru je jeho silná specifita a vysoké hladiny exprese v mozku. Uvolněním GFAP-BDPs se v těle spustí tvorba specifických autoprotilátek proti GFAP. Takové protilátky lze využít při sledování progresu gliomů. Zároveň, různé rozložení GFAP v blízkosti léze může poukazovat na různou závažnost gliózy (Yang, 2015).

Kromě astrocytů a Schwannových buněk lze GFAP nalézt také v buňkách ENS, kde tento protein reaguje na prozánětlivé signály. Podobně se hladiny GFAP chovají v tlustém střevě pacientů se zánětlivým onemocněním střev (inflammatory bowel disease, IBD) a mohou být užitečným indexem průběhu závažnějších forem IBD (Yang, 2015).

GFAP je definován zejména v souvislosti s astrocyty, kde je nezbytný v obnově hematoencefalické bariéry po poranění mozku. Mimo to je také exprimován hvězdicovitými buňkami a podílí se na vaskulární remodelaci tkání poškozených jaterní fibrózou. GFAP je markerem klidových hvězdicovitých buněk a markerem časně aktivace hvězdicovitých buněk (Gupta, 2019). Uvádí se, že GFAP by mohl představovat užitečnější marker časně aktivace hvězdicovitých buněk, než je  $\alpha$ -SMA (Hassan, 2014). Některé zdroje současně uvádí, že exprese GFAP koreluje s progresí jaterního poškození (Kim, 2018), jiné upřesňují, že se GFAP zvyšuje v akutní fázi poranění a v chronické dochází k jeho snížení (Carotti, 2008).

Často je také uváděno, že GFAP podléhá citrulinaci. Tuto jeho formu nalzáme v aktivovaných hvězdicovitých buňkách a předpokládá se, že tento proces má vliv na strukturu a funkci proteinu. Ve fibrotické tkáni došlo k průkazu zvýšené exprese nejen GFAP, ale právě i



jeho citrulinové formy, proto se předpokládá, že citrulinace GFAP souvisí s progresí jaterní fibrózy. Proto by pro sledování progresu jaterní fibrózy mohlo být využito nejen GFAP, ale také jeho citrulinové formy (Kim, 2018).

### 3.3.3. $\alpha$ -SMA

Aktinová filamenta jsou tvořena globulárními proteiny aktiny. Největší obsah aktinu je ve svalovině, kde představuje přibližně 50 % všech proteinů (Lüllmann-Rauch, 2012). Aktin je polypeptidový řetězec tvořený 374 aminokyselinami s celkovou molekulovou hmotností 42 kDa a průměrem 40–50 Å (Gao, 2017). V prostoru je pozorován jako plochá molekula s přibližnými rozměry 5,5 x 5,5 x 3,5 nm, která je členěná do dvou přibližně stejně velkých domén oddělených hlubokými zářezy, na jejichž dně je místo vázající ATP/ADP (Mannherz, 2017).

Aktin se u obratlovců vyskytuje v 6 různých isoformách kódovaných různými geny. Tím se liší od jednoduchých eukaryot, kde jsou isoformy aktinu kódované právě jedním genem (Jockusch, 2017). Jednotlivé isoformy aktinu se liší uspořádáním aminokyselin ve své struktuře pouze mírně, hlavní rozdíl je pozorován ve složení a délce terminálního N-konce řetězce. Isoformy potom rozdělujeme do skupin podle jejich izoelektrického bodu a tkáňové specifity na  $\alpha$ -aktin (3 formy),  $\beta$ -aktin a  $\gamma$ -aktin (2 formy) (Lüllmann-Rauch, 2012; Mannherz, 2017).

Isoformy  $\alpha$ -aktinu jsou exprimované v kosterním, srdečním a hladkém svalstvu (Lüllmann-Rauch, 2012). Tyto formy také nazýváme  $\alpha$ -skeletal muscle actin,  $\alpha$ -cardiac muscle actin a  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (Jockusch, 2017).  $\beta$ -aktin je označován jako cytoplazmatický non-muscle actin. První isoforma  $\gamma$ -aktinu je také označovaná jako cytoplazmatický non-muscle actin, zatímco druhá isoforma je součástí hladkého svalstva střev. Obě cytoplazmatické isoformy jsou exprimované čteně (Mannherz, 2017). Všechny isoformy aktinu jsou si velice podobné, největší rozdíl lze pozorovat mezi isoformami cytoplazmatickými a svalovými (Jockusch, 2017).

$\alpha$ -SMA je hlavní složkou hladkého svalstva cév (vaskular smooth muscle cells, VSMCs), kdy ve velkých arteriích je obsažen z 60 % (Gao, 2017). Je kódován genem ACTA2 umístěným na 10q22-q24 a složeným z 8 kódujících exonů. Mutace tohoto genu vedou k nejrůznějším vaskulopatiím, jako je například tzv. TAAD (thoratic aortic aneurysm and dissection) (Jockusch,



2017; Yuan, 2015). Tyto mutace způsobují zhoršenou funkci VSMCs, což vede ke snížené schopnosti těchto buněk vnímat mechanické stimuly buněčné matrix. Mutace způsobují patologickou hyperplazii způsobenou remodelací, degenerací a zvýšenou ztuhlostí cévní stěny. Ztráta  $\alpha$ -SMA je kompenzovaná zvýšenou hladinou  $\gamma$ -aktinu (Masset, 2020; Yuan, 2015). Změny v expresi  $\alpha$ -SMA mohou ovlivnit vaskulární rezistenci a hemorheologické vlastnosti krve (An, 2022).

Předpokládá se, že narušení aktinového cytoskeletu zapříčiňuje nedostatečné hojení ran se zvýšenou aktivitou MMP (matrix metaloproteináz) (Lino Cardenas, 2018). Apoptóza VSMC je závislá na expresi  $\alpha$ -SMA prostřednictvím signální dráhy kaspáz-3 (aktin se může stát substrátem kaspáz), přičemž vyšší náchylnost k apoptóze mají buňky se silnou koexpresí  $\alpha$ -SMA a PDI (proteindisulfidizomeráza). Nadměrná indukce apoptózy VSMC je škodlivá pro reparaci, popř. remodelaci vaskulární tkáně. Naopak slabá koexprese  $\alpha$ -SMA a PDI vede k proliferaci VSMC (Ping, 2017; Chen, 2020).

$\alpha$ -SMA stresová vlákna jsou charakteristickým znakem myofibroblastů i přesto, že některé zdroje dokonce uvádí, že  $\alpha$ -SMA buňky nejsou jediné, které jsou během fibrózy odpovědné za sekreci a kontraktilitu (Hillsley, 2021). Kromě  $\alpha$ -SMA to mohou být dále těžké řetězce myosinu, H1-kalponinu a jiné (Zhang, 2016).  $\alpha$ -SMA je také pokládán za nejpoužívanější biomarker pro identifikaci CAF (cancer associated fibroblast), které jsou považovány za základní složku v procesu onkogeneze (Tao, 2017). Fibroblasty jsou naprogramované tak, aby reagovaly na poškození tkání, zároveň se v aktivované formě vážou k syntéze molekul, regulují zánět a buněčný růst. Proto se bere v úvahu myšlenka, že fibroblasty mají nepřímou roli při růstu nádorů a případných metastáz (Bu, 2019), v několika studiích bylo dokonce uvedeno, že přítomnost CAF exprimujících vysokou hladinu  $\alpha$ -SMA koreluje se špatnou prognózou (Muchlińská, 2022).

### 3.3.4. Mac-2 (Galectin-3)

Mac-2 (také MAC2, carbohydrate-binding protein 35, CBP 35, macrophage galactose-specific lectin 3, galactose-binding protein, GALBP, Galectin-3, GAL3, IgE-binding protein, laminin-binding protein, lectin L-39) patří mezi solubilní neglykosylované lektiny, které vykazují afinitu k beta-galaktosidovým strukturám (Franeková, 2022). Původně byl identifikován v roce 1982 autory Hol a Springer jako povrchový antigen na myších makrofázích aktivovaných thioglykolátem (Hol, 1982).

Mac-2 je nejčastěji označován jako galectin-3. Je kódován jediným genem LGALS3 umístěným na 14. chromozomu s lokusem q21-q22. Má chimérickou strukturu s C-terminální karbohydrátovou (CRD) a N-terminální doménou. Pomocí CRD domény se váže na povrchové glykoproteiny (Franeková, 2022; Kram, 2023). CRD doména je tvořena ze 135 aminokyselinových zbytků a je charakteristická právě pro galectiny. N-doména se skládá ze 100-150 aminokyselinových zbytků tvořených opakující se sekvencí 9 aminokyselinových zbytků bohatých na prolin, glycin, tyrosin a glutamin (Sciacchitano, 2018). N-doména slouží k zesíťování sacharidových a nesacharidových ligandů (Henderson, 2006).

Galectin-3 se vyskytuje hlavně v makrofázích, epiteliálních, endoteliálních a dendritických buňkách. Zajišťuje intra- a extracelulární komunikaci s jádrem, povrchem buňky a extracelulární matrix (Franeková, 2022). Extracelulární galectin-3 tvoří na buněčném povrchu multimery, které se tvoří v přítomnosti zvýšené koncentrace multivalentních ligandů. Vzniká „mřížka“ účastníci se regulace receptorů, endocytózy a signalizace (Pugliese, 2015). Galectin-3 je schopen ovlivnit prezentování receptorů na povrchu buňky, jejich pohyb v membráně a působit změny v jejich funkčnosti (Franeková, 2022). Intracelulární galectin-3 se účastní sestřihu pre-RNA a regulace buněčného cyklu, čímž má kontrolu také nad proliferací, diferenciací a apoptózou buněk (Pugliese, 2015).

Velice zásadně se uplatňuje v patogenezi zánětu. Galectin-3 má prozánětlivé i protizánětlivé schopnosti v závislosti na typu tkáně a jejím stavu. Jeho protizánětlivé vlastnosti spočívají ve schopnosti vázat a likvidovat koncové produkty lipoxidace a pokročilé glykace (Pejnovic, 2016). Výraznější jsou však jeho prozánětlivé vlastnosti. Při akutním zánětu je ligandem pro Toll like receptory, zřejmě působí jako DAMP

(danger-associated molecular pattern) signál, aktivuje neutrofilu a inhibuje jejich apoptózu, extracelulárně inhibuje cytotoxické T-lymfocyty a způsobuje jejich apoptózu. Dále reguluje funkci makrofágů, včetně fagocytózy (Franecková, 2022), a je součástí alergických reakcí (Pugliese, 2015).

Další významnou roli sehraává galectin-3 v procesu fibrogenese, které se velice významně účastní jako aktivátor myofibroblastů (Henderson, 2006). Během chronického poškození jater je vylučován různými buňkami, včetně monocytů, makrofágů a poškozených hepatocytů, a mění klidové hvězdčité buňky na aktivované buňky charakteru myofibroblastů, které ukládají kolagen v extracelulární matrix. Zvýšená exprese galectinu-3 je pozorována právě ve spojitosti s jaterní fibrózou či cirhózou, nealkoholickou steatohepatitidou nebo s hepatocelulárním karcinomem. Působení galectinů spočívá v tvorbě oligomerů, jejich následnému zesíťování a tvorbě charakteristické „mřížky“, která aktivuje signální dráhy na povrchu buňky (Kram, 2023; Ezhilarasan, 2023). Galectin-3 umožňuje aktivaci makrofágů alternativní cestou přes IL-4 a tyto makrofágy pak aktivují profibrotické geny a zhoršují fibrózu (Pejnovic, 2016). Studie naznačují, že lze galectin-3 považovat za užitečný marker pro predikci tkáňové fibrózy (Sciacchitano, 2018).

V konečném souhrnu vnímáme galectin-3 jako regulační molekulu, jenž se vyskytuje ve všech stádiích reparace tkáně, od iniciační fáze zánětu, přes podporu fibrogenese až po opravu tkáně (Pugliese, 2015). Vzhledem k tomu, že hraje zásadní roli v aktivaci hvězdčovitých buněk, je tudíž možné o galectinu-3 uvažovat jako o potenciálním terapeutickém cíli při léčbě jaterní fibrózy (Henderson, 2006; Traber, 2013; Sumida, 2018).

Mnoho studií se dále zabývá podobnými proteiny. Protein vázající Mac-2 (M2BP) je buněčně adhezivní glykoprotein. M2BP je produkován hvězdčovitými buňkami a je přítomen v malém množství v mnoha tkáních lidského těla. Vylučuje se do séra, extracelulární matrix a kultury rakovinových linií (Nagaoka, 2021; Mak, 2019). Lidský endogenní M2BP je složen z 10-16 monomerů se 70-112 N-glykany připojenými ke každé makromolekule (Nah, 2020). Protein vázající Mac-2 (M2BP) patří mezi scavengerové receptory a má několik glykosylačních míst. Abnormální glykosylaci Mac-2 BP vzniká jeho glykosylační izomer, který má ve své struktuře více větvené a sialylované N-glykany (El-Aziz, 2020; Kiyooki, 2022).

Glykosylační izomer proteinu vázajícího Mac-2 (M2BPGi) zřejmě slouží jako posel mezi hvězdovitými a Kupfferovými buňkami prostřednictvím Mac-2. Podporuje Kupfferovy buňky k expresi Mac-2 a je schopen aktivovat hvězdovité buňky (Shirabe, 2018; Yamada, 2019; Park, 2022). M2BPGi tedy může být náhradním markerem aktivace hvězdovitých buněk (Shirabe, 2018). Byla dokonce nalezena pozitivní korelace mezi M2BPGi a  $\alpha$ -SMA, tj. dvěma markery aktivace hvězdovitých buněk. Lze tedy usuzovat, že M2BPGi není přímo markerem jaterní fibrózy, který by odrážel množství kolagenové tkáně, ale spíše markerem fibrogenese, který odráží aktivaci hvězdovitých buněk (Yamada, 2019).

M2BPGi je v pořadí dalším sérovým markerem vhodným pro diagnostiku jaterní fibrózy s širokou etiologií. Je vhodný pro diagnostiku nejen NASH, ale i dalších onemocnění jater (chronická hepatitida, autoimunitní hepatitida, biliární cholangitida a další) (Kiyooki, 2022). M2BPGi je schopen hodnotit nejen jaterní fibrózu, ale také prognózu a vývoj hepatocelulárního karcinomu (Tamaki, 2021), nebo třeba funkčnost jater po hepatektomii (Yamada, 2019). Rovněž lze předpokládat, že by tento protein měl být užitečným a dostatečným markerem k odlišení NAFLD a NASH (El-Aziz, 2020).

### 3.4. Zvířecí model

Pro vývoj nových terapeutických strategií a léčiv je nejprve důležité pochopení řady mechanismů v patogenezi a progresi jaterního poškození. Vzhledem ke složitosti mechanismů je limitujícím faktorem nedostatek vhodných zvířecích modelů, které by přesvědčivě napodobily jaterní onemocnění u lidí (Malečková, 2019). Zvířecí model napodobuje reálnou situaci v jednodušším provedení s cílem pozorovat, popř. modifikovat v modelovém procesu reakci živého systému (Hložková, 2019).

Největší skupinu modelů pro jaterní onemocnění představují hlodavci, tj. myši, krysy a potkani. Jejich anatomická a fyziologická podobnost s lidmi je dosti rozdílná, proto jejich použití jako modely lidských jaterních onemocnění jsou relativně omezená (Malečková, 2019). Nicméně hlodavci, zejména myši, mají mnoho experimentálních výhod: svým vzrůstem jsou drobní, mají krátký životní cyklus a březost a vykazují pohodlnou genetickou manipulaci ke studiu specifických genů a možných terapeutických cílů (Mariotti, 2018). Důležitou roli dále hrají také velké zvířecí modely, tj. prasata, které jsou používány ke studiu akutních a chronických jaterních onemocnění. Obecně neexistuje takový zvířecí model, který by zahrnoval veškeré klinické aspekty pozorované u lidí (Malečková, 2019), tudíž nikdy nenahradí klinickou studii (Hložková, 2019).

#### 3.4.1. Standardní dietní model („chow diet“)

Tento typ popisuje různé diety založené na bázi obilovin a přísad, jako jsou sójová moučka, rybí moučka, mletá kukuřice a další produkty živočišného původu. Důležité je, že přibližně 20 % směsi tvoří rozpustná a nerozpustná vláknina z různých zdrojů a toto množství je až čtyřikrát vyšší než u purifikované stravy. Vysoký obsah vlákniny má příznivý vliv na hladinu cholesterolu v krvi, naopak u purifikované stravy jsou hladiny cholesterolu vyšší (Pellizzon, 2016; Almeida-Suhett, 2019).

Receptury standardní diety jsou výrobci patentované a složení jednotlivých šarží se může často lišit (Pellizzon, 2016). Tato dieta také může obsahovat vysoké hladiny polyfenolů a fytoestrogenů (vojtěška, sója), které mohou ovlivnit procesy metabolismu (Almeida-Suhett, 2019).

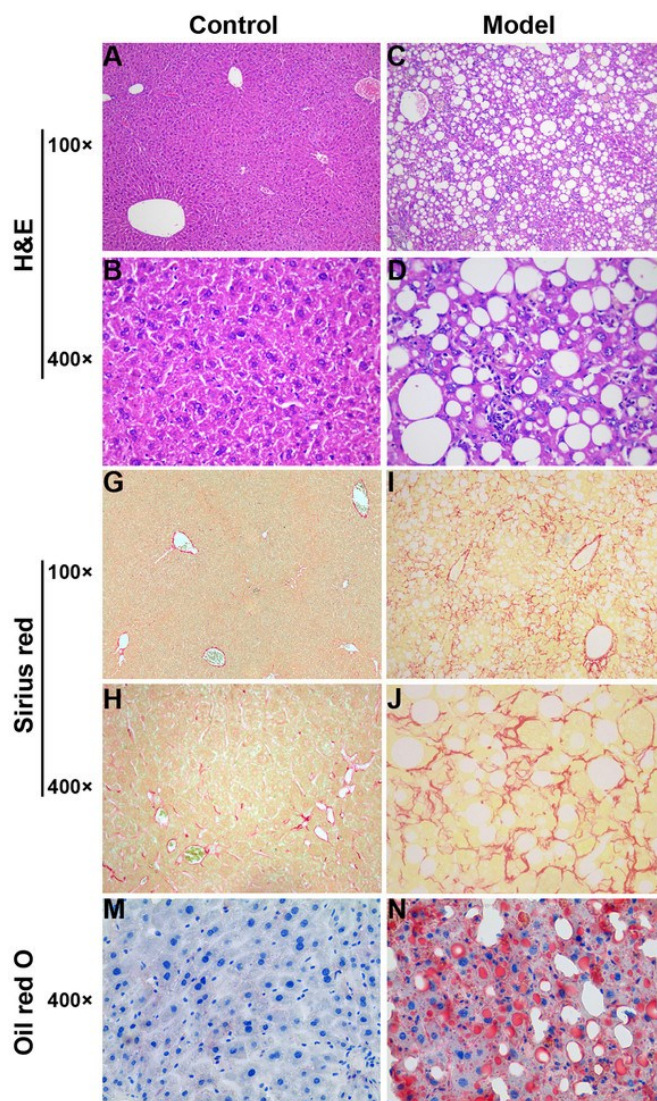
Opakem je purifikovaná strava. Receptura není patentovaná, je otevřena novým výzkumům, a tudíž i relativní množství jednotlivých složek v jednotlivých šaržích je známé. Mezi přísady této stravy patří rafinované složky jako kasein (bílkovinná složka), kukuřičný škrob (sacharid), sójový olej (tuk) a celulóza (vláknina). Jednotlivé složky mohou být upravované podle požadavků výzkumníka, čímž se zásadně liší od klasické „chow diet“ (Pellizzon, 2016).

### 3.4.2. CDAA-HFD dietní model

Jedním z vhodných modelů pro navození NASH je CDAA-HFD (choline-deficient L-amino acid defined high fat diet). Jedná se o dietu s definovaným množstvím L-aminokyselin, deficitem cholinu a vysokým obsahem tuku. V porovnání s ostatními dietními modely schopnými rovněž navodit steatózu jater lze CDAA-HFD využít k navození závažnějších forem NASH s fibrózou (Sugasawa, 2021).

Cholin je základní živinou, která se metabolizuje a ukládá v játrech (Lau, 2017). Nedostatek cholinu vede k nemožnosti syntetizovat fosfatidylcholin, který hraje důležitou roli v sekreci VLDL, a dochází tak k akumulaci triglyceridů v játrech (Matsumoto, 2013). Nedostatek methioninu vede rovněž k nedostatku lipoproteinů v játrech (Ikawa-Yoshida, 2017).

Použitím CDAA-HFD navodíme steatózu, balonování hepatocytů, zánětlivé změny ve tkáni a progresivní fibrózu (Obr. 8). Zároveň pozorujeme metabolické abnormality, kterými jsou hlavně zvýšená hmotnost jater, vysoké hladiny enzymů ALT (alaninaminotransferáza) a AST (aspartátaminotransferáza) značící jaterní poškození (Hoffmann, 2020) a snížené sérové hladiny lipoproteinů. Myši krmené CDAA-HFD mají přírůstek na váze menší v porovnání s myšmi se standardní laboratorní dietou (Lu, 2019).



**Obrázek 8** Vliv CDAA-HFD na histologii jater (převzato a upraveno z: Lu, 2019).

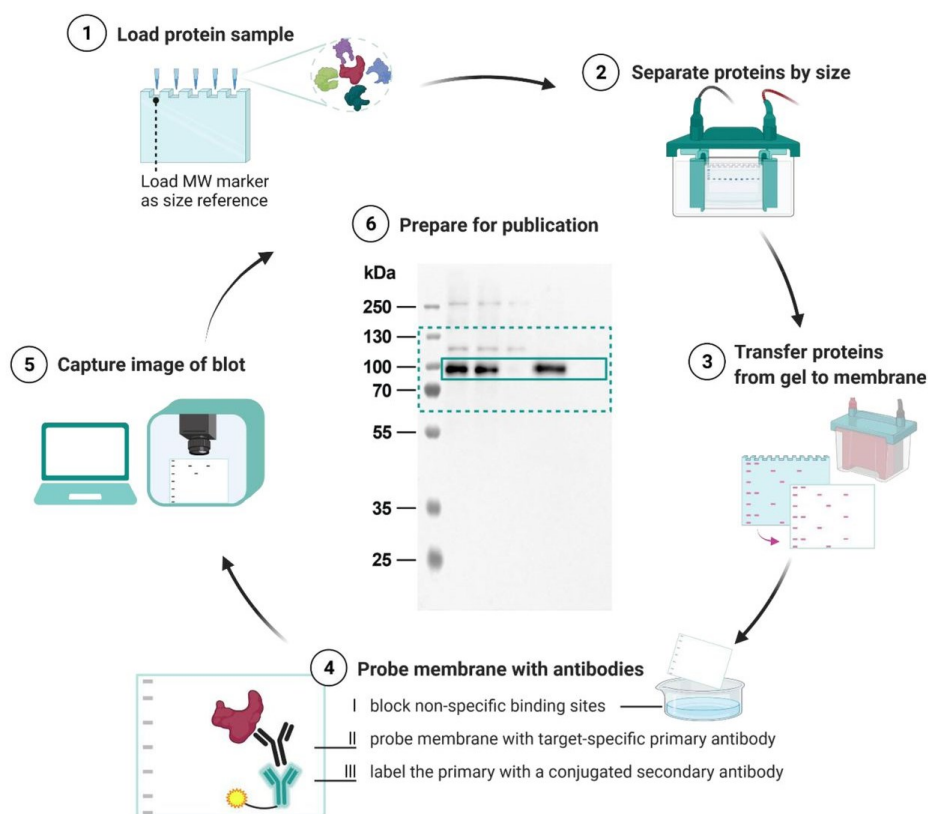
Nadměrná akumulace tukových kapének, střední zánětlivá ložiska a balonující hepatocyty u CDAA-HFD v porovnání s kontrolou, barveno H&E a zvětšeno 100x a 400x (A-D); fibróza u CDAA-HFD v porovnání s kontrolou, barveno saturnovou červení a zvětšeno 100x a 400x (G-J), akumulace lipidů u CDAA-HFD v porovnání s kontrolou, barveno olejovou červení a zvětšeno 100x a 400x (M a N).

CDAA-HFD je schopna velice rychle indukovat jaterní fibrózu a je užitečným modelem pro výzkum NASH (Matsumoto, 2013). Zároveň dlouhodobé podávání CDAA-HFD vede k rozvoji cirhózy a hepatocelulárního karcinomu (Wei, 2020; Ikawa-Yoshida, 2017).

### 3.5. Western blot

Western blot patří mezi nejpoužívanější metody v molekulární biologii a proteomice (Mishra, 2017). Účelem western blotu je separovat v gelu proteiny podle molekulové hmotnosti a přenést je v dalším kroku na membránu, kde mohou být pomocí značených protilátek detekovány (Abcam, 2020). Principem této metody je specifická interakce antigen-protilátka, díky níž je western blot užitečnou technikou pro kvalitativní či semikvantitativní analýzu proteinů, dokonce i v komplexních vzorcích (Hnasko, 2015).

Tato metoda se skládá z mnoha kroků: příprava vzorků (extrakce proteinu a měření koncentrace proteinu), separace proteinů elektroforézou, přenos proteinů na membránu, blokování nespecifických proteinů na membráně, označení cílových proteinů specifickými primárními protilátkami, inkubace se značenými sekundárními protilátkami a detekce/denzitometrická analýza (Obr.9) (Mishra, 2017).



**Obrázek 9** Přehled postupu pro metodu western blot (převzato z: Kroon, 2022).

Vzorek (tj. směs proteinů) se nanese na gel, do první pozice se aplikuje marker obsahující značené proteiny známých MW (molecular weight, molekulová hmotnost) (1), separace proteinů podle MW pomocí gelové elektroforézy (2), přenos proteinů z gelu na membránu (3), vazba protilátek na membránu (I blokování nespecifických míst, II vazba primárních protilátek, III vazba značených sekundárních protilátek) (4), detekce (5), odečtení vzniklých bandů (6).



Příprava vzorku je velice zásadním krokem a může být spojena hned s několika úskalími. Jsou jimi nesprávná manipulace se vzorky, nesprávné složení lyzačního pufru a špatně zvolená technika homogenizace (Taylor, 2014). Důležité je také určení koncentrace vytvořeného extraktu. Díky tomu jsou vzorky porovnávány na ekvivalentním základě (Mahmood, 2012).

Elektroforéza oddělí proteiny ve směsi na dodecylsulfátovém polyakrylamidovém gelu na základě jejich molekulových hmotností. Separované proteiny jsou v dalším kroku přeneseny na membránu (Tie, 2021) pomocí elektrického proudu, který indukuje jejich migraci z gelu na membránu (Abcam, 2020). Nejběžnější metodou blotování je přenos mokrou a polosuchou cestou. Blotování mokrou cestou je vhodné pro proteiny s nízkou až vysokou molekulovou hmotností a trvá zhruba 1 hodinu. Gel a membrána jsou spolu s filtračním papírem a houbami vertikálně ponořeny do kazety a vystaveny elektrickému poli. Záporně nabitě proteiny potom migrují z gelu ke katodě na membránu. Polosuché blotování je vhodné pro proteiny s menší molekulovou hmotností (max. 300 kDa) a trvá 10-60 minut. „Sendvič“ je tentokrát v horizontálním uspořádání (Steward, 2015-2023).

Jakmile jsou proteiny přeneseny na membránu, následuje blokování. Blokování zabraňuje vzniku nespecifických vazeb protilátek na membránu a je velice důležitým krokem. Provádí se pomocí 5% BSA (hovězí sérový albumin) nebo odtučněného sušeného mléka ředěného TBS (tris buffer saline). Sušené mléko je díky nízké ceně používanější variantou (Mahmood, 2012). Po blokování nespecifických míst jsou membrány inkubovány s primární a po několikanásobném promytí i se sekundární protilátkou značenou chemiluminiscenčním detekčním činidlem (Taylor, 2013).

Vzhledem k množství kroků v této metodě neexistují žádná konkrétní nastavení optimálních podmínek, které by byly vhodné pro všechny zkoumané proteiny. Výzkumníci si obvykle volí optimální podmínky sami tak, aby vytvořili co nejlepší poměr signálu a šumu, a získali tím co nejkvalitnější výsledky (Tie, 2021).

Výhodou této metody je vysoká specifita. Je možné porovnávat velké množství proteinů v různých vzorcích a zároveň vyloučit falešnou pozitivitu způsobenou nespecifickým navázáním protilátek, neboť máme znalosti o molekulových hmotnostech těchto proteinů. Nevýhodou může být detekce velkých proteinů, které během elektroforézy obtížně prochází gelem. Další významnou nevýhodou je velká časová náročnost této metody, vyšší potřeba vzorků a obtížná automatizace (Baria, 2022).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Experimentální zvířata

K experimentu byla využita skupina 9týdenních myších samců kmene C57BL/6J. Byli chováni za standardních podmínek s volným přístupem ke krmivu a vodě. Studovaní jedinci byli na začátku experimentu nezávisle rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina (n=6) a CDAA-HFD skupina (n=8).

Kontrolní skupina byla krmena standardní laboratorní dietou (tzv. chow diet), zatímco druhá skupina měla k dispozici CDAA-HFD (tj. choline-deficient L-amino acid defined high fat diet). Cílem krmení touto dietou byla indukce nealkoholické steatohepatitidy (NASH) u sledované skupiny. Složení CDAA-HFD bylo následující: dieta s podílem L-aminokyselin s 60 kcal% tuku s 0,1 % methioninu a bez přidaného cholinu. V průběhu experimentu byli myši samci pravidelně 2krát týdně váženi.

Po uplynutí 4 týdnů byli jedinci obou skupin naposledy zváženi a utraceni. Každému z nich byla odebrána krev z *vena cava inferior* a vzorky jater. Získaná krev (cca 500  $\mu$ l) byla pro svoji přirozenou krátkodobou stabilitu okamžitě stočena na centrifuze při 10 000 rpm po dobu 5 minut, čímž se získala krevní plazma. Ještě před stočením byla část krve (100  $\mu$ l) podrobena biochemické analýze na analyzátoru, viz níže. Odebrané vzorky jater byly ihned po zvážení vloženy do tekutého dusíku a poté uskladněny (při teplotě - 80 °C) do té doby, než byly použity v další analýze (viz western blot).

Se všemi jedinci bylo nakládáno podle pokynů Etické komise Farmaceutické fakulty Karlovy Univerzity, která stanovuje pravidla zajišťující dobré životní podmínky laboratorních zvířat podle zákona č. 246/1992 Sb.

## 4.2. Biochemická analýza

Tato práce byla také doplněna o biochemickou analýzu krve a zhodnocení některých indikátorů poškození jater. Pro analýzu byly zvoleny následující: ALT (alaninaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza) a celkový bilirubin. Tyto parametry byly získány pomocí analyzátoru Preventive Care Profile Plus test and Vet Scan2 (Abaxis Germany).

ALT se vyskytuje v hepatocytu a její zvýšení indikuje i mírné poškození hepatocytů. AST se vyskytuje částečně v cytoplazmě (30 %) a částečně v mitochondriích (70 %). V porovnání s ALT indikuje vážnější poškození buňky, tj. její rozpad. Oproti ALT se však vyskytuje nejen v hepatocytech, ale také ve svalových buňkách, v ledvinách, mozku, pankreatu a v erytrocytech. Z toho důvodu není zvýšení AST indikací pouze jaterního poškození, ale může stejně tak znamenat i poškození zmíněných orgánů (Lahoda Brodská, 2022).

Hladiny ALT a AST jsou zvýšeny v séru u většiny jaterních onemocnění. Aktivita ALT bývá vyšší než aktivita AST, výjimku tvoří alkoholové jaterní poškození a Reyův syndrom (Hůlek, 2018). Při vyšetření jaterního poškození využíváme poměru obou transamináz. Míra jeho vzestup zrcadlí rozsah jaterního poškození (Lahoda Brodská, 2022). Obecně jsou taková laboratorní vyšetření označována jako *testy odrážející integritu hepatocytů* (tzv. „jaterní testy“). Nicméně aktivita obou enzymů velice často kolísá během samotného dne, a to i u zdravých osob, dále ve spojitosti s obezitou nebo intenzivní pohybovou aktivitou. V dospělosti jsou aktivity těchto enzymů vyšší u mužů než u žen. Do 15. roku života je aktivita AST lehce vyšší než ALT, v dospělosti je naopak lehce zvýšená aktivita ALT, po 60. roce jsou hladiny shodné (Hůlek, 2018).

Kromě stanovení ALT/AST jsou velmi přínosná i další biochemická vyšetření krve, celkové bílkoviny, hladiny albuminu či použití protrombinového testu (Lukáš, 2022).

Bilirubin je produktem rozpadu erytrocytů. Vzniká při degradaci hemu, tudíž malá část bilirubinu pochází také z myoglobinu a z cytochromů (Hůlek, 2018). V krvi je vázán na albumin jako nepřímý bilirubin, v játrech je konjugován s kyselinou glukuronovou na bilirubin přímý, odkud je transportován do žluči a vyloučen do střeva. Poškození hepatocytu vede k poruchám konjugace, v důsledku čehož dochází ke zvýšení nekonjugovaného i konjugovaného bilirubinu, tzv. celkového bilirubinu (Lahoda Brodská, 2022).

Hodnoty bilirubinu mají největší význam v diagnostice primární biliární cirhózy a akutního jaterního selhání, ale jsou významné i při pokročilé jaterní cirhóze. Hladiny bilirubinu jsou lehce nižší u žen, v graviditě a po užívání perorální antikoncepce (Hůlek, 2018).

## 4.3. Postup práce pro metodu western blot

### 4.3.1. Homogenizace tkání, izolace proteinů a stanovení koncentrace

Vzorky odebrané jaterní tkáně byly vloženy do tekutého dusíku a skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do té doby, než se přistoupilo k dalšímu kroku. Dále byla provedena homogenizace a poté příprava celkové a membránové frakce proteinů. Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita bicinchoninová metoda. Tato metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA), která vytváří komplexy s měďnými ionty, které vznikají reakcí iontů měďnatých s peptidovou vazbou v zásaditém prostředí. Tato metoda využívá barevné reakce a následného spektrofotometrického stanovení (Cortés-Ríos, 2020).

### 4.3.2. Metoda western blot

#### 4.3.2.1. Příprava gelu

Prvním krokem celého procesu byla příprava aparatury. Aparatura pro přípravu gelu (Mini-PROTEAN® Tetra Cell kit; *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) zahrnovala stojánek a 2 typy skel (větší z nich orientované do zadní části stojánku, menší z nich dopředu). Bylo nutné, aby skla byla dokonale čistá a suchá, teprve potom mohla být zasazena do stojánku. Těsnost a nepropustnost aparatury bylo potřeba na závěr zkontrolovat pomocí Milli-Q vody. Prostor mezi skly byl vodou naplněn a pokud ani po pár minutách nejevila aparatura známky propustnosti, voda byla vylita a aparatura vysušena.

Na přípravu separačního gelu byla potřeba smísit Milli-Q vodu, pufr pro separační gel, akrylamid-bis roztok, 10% SDS (sodium-dodecyl sulphate) a 10% APS (ammonium persulphate). Jako poslední byl pipetován TEMED (tetramethyldiamin), po jehož přidání začíná gel polymerovat. Množství jednotlivých komponent závisí na tom, jakou požadujeme finální koncentraci gelu. Koncentraci separačního gelu volíme podle molekulové hmotnosti detekovaného proteinu. Pro tento experiment byla zvolena příprava gelů o koncentraci 8 % (GFAP), 10 % ( $\alpha$ -SMA, GAPDH) a 12 % (Mac-2). Množství jednotlivých komponent pro přípravu separačního gelu v Tab. 1 jsou uvedena pro přípravu 2 gelů. GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) představuje v této práci vnitřní kontrolu nanášky pro metodu western blot.

**Tabulka 1 Složení separačních gelů**

<b>Komponenty</b>	<b>8 % (ml)</b>	<b>10 % (ml)</b>	<b>12 % (ml)</b>
Milli-Q voda	5,400	4,900	4,400
Pufr pro separační gel	2,500	2,500	2,500
Akrylamid-bis roztok	2,000	2,500	3,000
10 % SDS	0,100	0,100	0,100
10 % APS	0,030	0,030	0,030
TEMED	0,015	0,015	0,015

Připravený separační gel byl neprodleně napipetován do prostoru mezi skly do výšky 1,5 cm pod horní okraj kratšího skla. Zbýlý prostor (mezi gelem a hranou skla) byl vyplněn ještě isobutanolem, jedná se přibližně o 1 cm. Polymerace gelu se pohybovala v rozsahu 30-60 minut. Poté byl za pomoci Milli-Q vody isobutanol odplaven a prostor nad gelem opět dokonale vysušen.

Následující postup zahrnuje přípravu zaostřovacího gelu. Všechny jeho komponenty se shodují s komponenty k přípravě separačního gelu, s výjimkou pufru pro zaostřovací gel, který nahrazuje původní pufr pro separační gel. Koncentrace zaostřovacího gelu se již neodvíjí podle detekované protilátky, ale je ve všech případech stejná, a to 5 %. Připravenou směsí byl vyplněn celý prostor mezi skly nad gelem až po horní okraj a do ní byl zasunut teflonový hřebínek. Mezi hřebínkem a okrajem skla se tvoří menší mezera, která byla směsí na zaostřovací gel vyplněna. Polymerace trvala opět 30-60 minut. Množství jednotlivých komponent pro přípravu zaostřovacího gelu v Tab. 2 jsou uvedena rovněž pro přípravu 2 gelů.

**Tabulka 2 Složení zaostřovacího gelu**

<b>Komponenty</b>	<b>5 % (ml)</b>
Milli-Q voda	6,150
Pufr pro zaostřovací gel	2,500
Akrylamid-bis roztok	1,250
10 % SDS	0,100
10 % APS	0,030
TEMED	0,015

#### 4.3.2.2. Příprava vzorků

Vzorky byly naředěny 1:1 nanášecím pufrem (množství pro 1 gel: 6  $\mu$ l vzorku + 6  $\mu$ l pufru). Velice důležitým krokem bylo pracovat se vzorky rychle a udržovat je po celý čas v ledové drti, a to do té doby, než je k nim přidán právě nanášecí pufr. Současně se vzorky byl obdobně připraven i marker (6  $\mu$ l markeru + 6  $\mu$ l pufru) (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*). Vzorky a marker byly v centrifuze stáčeny při 5000 rpm po dobu 45 vteřin a poté vloženy do vodní lázně o 95 °C na 5 minut. Po vyjmutí z vodní lázně byly vzorky ponechány při pokojové teplotě po dobu 5 minut a opět byly stočeny v centrifuze, avšak tentokrát po dobu 30 vteřin.

#### 4.3.2.3. Gelová elektroforéza

Soustava skel s již zatuhlým gelem byla vyjmuta z původní aparatury a přemístěna do stojánku pro elektroforézu, vždy dvě soustavy skel proti sobě (kratšími sklíčky dovnitř stojánku). Stojánek byl vyplněn elektroforetickým pufrem, jelikož gel musí být po celou dobu práce se vzorky v pufru ponořený, aby nedošlo k jeho vysušení. Stojánek vyplněný pufrem nám opět slouží jako kontrolní bod práce, kdy zjišťujeme, zda soustava těsní a neprotéká. Elektroforetický pufr byl připraven podle následujícího poměru: 100 ml 10x koncentrovaného pufru (10x Tris/Glycine/SDS, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) bylo doplněno do objemu 1000 ml pomocí Milli-Q vody.

Jakmile byl gel ponořen do pufru, byl z něj vytažen teflonový hřebínek velice pomalým pohybem směrem vzhůru. V místě hřebínku vznikla místa pro aplikaci vzorků. Do první jamky zleva byl aplikován marker, do všech ostatních vzorky.

Stojánek byl přemístěn do vany pro elektroforézu. Vana byla po příslušnou značku („2 gely“, popř. „4 gely“) doplněna elektroforetickým pufrem a přiklopena víkem. Víko obsahuje elektrody a je zapotřebí sledovat barevné značení vyskytující se současně na víku a na zdroji napětí (značení tzv. „červená k červené, černá k černé“). Tato elektroforetická sestava byla připojena do zdroje podle instrukcí v Tab. 3. Dále bylo nezbytné obložit sestavu ledovými pláty, aby se sestava příliš nezahřívala.

**Tabulka 3 Parametry pro nastavení elektroforetických podmínek pro 2 gely**

Napětí	200 V
Elektrický proud	30 mA
Čas	cca 1,5 hod.

Trvání elektroforézy může být rozdílné, proto bylo třeba sledovat její průběh. Proces byl zastaven ve chvíli, kdy barevná linie postupující gelem téměř dosáhla konce gelu.

#### 4.3.2.4. Blotování mokrou cestou

Prvním krokem této fáze bylo aktivovat membránu, aby mohla být později použita k přenosu proteinů. Byla použita PVDF (polyvinylidene difluoride) membrána (Immobilon®-P PVDF Membrane, *Sigma-Aldrich Inc., MO, USA*), která byla upravena do obdélníkovitého tvaru o velikosti 9,5 cm x 6,5 cm. Ve chvíli, kdy byla z membrány před jejím použitím sejmuta ochranná vrstva, bylo možné jí uchopit pouze pinzetou. Aktivace membrány se skládala ze 2 kroků: nejprve byla ponořena do methanolu na dobu 30 sekund, poté 25 minut do transportního pufru. Oba kroky musely probíhat na třepačce.

Transportní pufr byl připraven podle následujícího poměru: 100 ml 10x koncentrovaného pufru (10x Tris/Glycine/Buffer for Western Blots and Native Gels, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*), 200 ml methanolu a vše doplněno do objemu 1000 ml pomocí Milli-Q vody. Z důvodu vznikající exotermické reakce se přidává methanol jako poslední v pořadí a celá směs musí být uložena před použitím do chladu.

Po skončení elektroforézy a odpojení soustavy od zdroje, byly vyjmuty stojánky a z nich sklíčka s gely. Sklíčka s gely, která nebyla zrovna používána, byla ponechána ponořená v pufru. Veškeré komponenty pro sestavení „sendviče“ bylo nutné s dostatečným předstihem ošetřit a po celou dobu udržovat v transportním pufru.

Skla s gelem byla od sebe oddělena a byl z nich opatrně pomocí plastové lopatky vyjmut gel. Gel byl ponořen do Petriho misky s transportním pufrům a otočen do správného směru (marker vpravo). „Sendvič“ byl do kazety poskládán z jednotlivých komponent v následujícím pořadí: houba, tlustý filtrační papír, gel, aktivovaná membrána, tlustý filtrační papír, houba. Před položením poslední vrstvy (houba) bylo potřeba celý „sendvič“ silně uchopit a pomocí válečku z něj pohybem do stran vytlačit všechny bubliny.



Vytvořený „sendvič“ byl uzavřen do kazety, zasunut do stojánku a vložen do vany. Vanu bylo potřeba po značku doplnit transportním pufrem. Opět byla celá sestava, doplněna ještě o víko, připojena ke zdroji napětí (viz. barevné značení jako u elektroforézy), tentokrát však za odlišných podmínek (Tab. 4). Opět sestavu obložíme pláty ledu. Pro blotování byla použita souprava Mini-Trans-Blot® Cell kit; (*Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*).

**Tabulka 4 Parametry pro nastavení podmínek pro přenos proteinů**

Napětí	140 V
Elektrický proud	300 mA
Čas	cca 1,5 hod.

Po uplynutí procesu byla soustava odpojena od zdroje, odejmuto víko a vytažen stojánek s kazetou. Kazeta byla otevřena a gel opatrně oddělen od membrány. Pokud s membránou není manipulováno, je nutné zabránit jejímu vysušení a nechat ji uloženou v transportním pufu.

#### 4.3.2.5. Aplikace protilátek

Nejprve bylo zapotřebí připravit roztok TBS-T. K tomu byl použit následující poměr: 200 ml 10x koncentrovaného TBS (Tris buffer saline), 1800 ml Milli-Q vody a doplněné ještě o 2 ml Tween® 20 (*SERVA Electrophoresis GmbH, Germany*). Tween® 20 je velice viskózní roztok, se kterým je potřeba i odpovídajícím způsobem pracovat. Výsledný roztok TBST-T byl nakonec promíchán na magnetické míchačce.

Následně byl připraven 5% roztok mléka, a to podle následujícího poměru: 5 g sušeného nízkotučného mléka (Blotting-Grade Blocker, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) a 95 ml již připraveného roztoku TBS-T. Roztok mléka byl promíchán na magnetické míchačce.

Během předchozího procesu blotování byly na membránu přeneseny z gelu proteiny a díky současně se vzorky aplikovanému hmotnostnímu markeru bylo snadno detekovatelné, ve kterých místech se námi hledané proteiny nachází. Hmotnostní marker vytvořil sadu modře zbarvených proužků, z nichž každý představuje proteiny vyskytující se v určitém rozmezí molekulových hmotností. Na základě těchto poznatků byla membrána nastříhaná na proužky, ve kterých byl předpokládán výskyt i našich proteinů. V této práci byly hledány tyto proteiny: GFAP (50 kDa),  $\alpha$ -SMA (42 kDa), GAPDH (37kDa) a Mac-2 (30 kDa).

Před aplikací protilátek bylo potřeba zablokovat nespecifická místa na membráně. Nastříhané proužky proto byly ponořeny do připraveného 5% roztoku mléka, umístěny na třepačku a inkubovány po dobu 1 hodiny.

Po blokaci nespecifických míst mohly být na hledané proteiny specificky navázány primární protilátky. Pro tyto účely byly naředěny do potřebné koncentrace vybrané primární protilátky v 5% roztoku mléka (Tab. 5).

**Tabulka 5 Primární protilátky a jejich ředění**

Protein	Primární protilátka	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění protilátky
GFAP	rabbit	Thermo Fisher (MA, USA)	PA5-16291	1:1000
$\alpha$ -SMA	rabbit	(Abcam, Cambridge, UK)	ab5694	1:500
Mac-2	rat	Thermo Fisher (MA, USA)	14-5301-82	1:1000
GAPDH	rabbit	Cell Signaling Technology (MA, USA)	2118	1:8000

Proužky byly v roztoku s protilátkou uloženy přes noc v chladu (4 °C). Druhý den byly proužky promyty 5 x 10 minut v roztoku TBS-T. Pro promytí k nim byly aplikovány sekundární protilátky. Sekundární protilátky byly naředěny obdobně jako primární protilátky v 5% roztoku mléka (Tab. 6).

**Tabulka 6 Sekundární protilátky a jejich ředění**

Protein	Sekundární protilátka	Výrobce	Katalogové číslo	Ředění protilátky
GFAP	anti-rabbit	(Abcam, Cambridge, UK)	ab6112	1:2000
$\alpha$ -SMA	anti-rabbit	(Abcam, Cambridge, UK)	ab6112	1:2000
Mac-2	anti-rat	Cell Signaling Technology (MA, USA)	7077S	1:2000
GAPDH	anti-rabbit	Cell Signaling Technology (MA, USA)	7074S	1:10000

Proužky byly v sekundární protilátce ponechány na třepačce 1 hodinu a poté v druhém kole opět promyty 5 x 10 minut v roztoku TBS-T. Proužky bylo nutné uchovat v témže roztoku TBS-T do té doby, než se postoupí k dalšímu kroku.

### 4.3.3. Chemiluminiscenční analýza

Posledním krokem western blot analýzy byla detekce. Všechny kroky musely probíhat velice rychle. Začínalo se přípravou detekčního roztoku (resp. chemiluminiscenčního substrátu) do větší vialky. Jednalo se o směs dvou komerčních roztoků (roztok 1 byl uložen v chladu, roztok 2 byl uchován při pokojové teplotě) typu Pico (Super Signal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate; *Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA*) či Femto (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate; *Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA*). Aktivní chemiluminiscenční substrát byl připraven v čase potřeby smícháním dvou roztoků ve vzájemném poměru 1:1 v takovém finálním množství, aby jím mohl být pokryt celý povrch proužku. Směs byla promísena ve vortexu a aplikována na proužek. Zde bylo důležitým krokem zkontrolovat, zda je pokryt jeho celý povrch a zda se v roztoku na povrchu proužku nevyskytují bubliny. Detekční roztok byl na proužku ponechán k působení přesně stanovený čas. Podmínky pro typ detekčního roztoku a jeho doba inkubace na proužku membrány jsou zaznamenány v Tab. 7.

**Tabulka 7 Volba detekčního roztoku a délka jeho inkubace**

Protein	Detekční roztok	Inkubace (min.)
GFAP	Pico	3
$\alpha$ -SMA	Pico	3
Mac-2	Pico	3
GAPDH	Pico	2

Po uplynutí času inkubace byl detekční roztok z proužku opatrně slit pryč. Proužek byl položen na vrstvu gázy, uzavřen do plastové folie a pohybem ruky a mírným tlakem byl z proužku pod folií odstraněn přebytek detekčního roztoku. Celá tato sestava byla vložena do detektoru.

Výsledkem detekce byly šedočerné pruhy (tzv. bandy) o různé tloušťce a intenzitě zbarvení. Analýza byla prováděna v detekčním přístroji ChemiDoc a softwaru ImageLab verze 6.0.1 (*Bio-Rad*).

#### 4.4. Statistická analýza

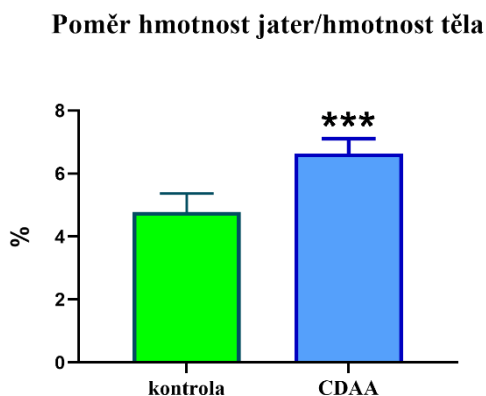
Pro zpracování výsledků všech analýz byl použit software GraphPad Prism 8.0 (*San Diego, CA, USA*). K porovnání dat mezi dvěma různými skupinami a k ověření statistické významnosti byl vybrán Mann-Whitney test. Pomocí tohoto testu byly stanoveny hladiny statistické významnosti, tj.  $p$ -hodnota. Uvedená hodnota pro vyjádření statistické významnosti byla do grafu zaznamenána symbolem „\*“ (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Všechny výsledky jsou v grafech prezentovány jako medián hodnot s mezikvartilovým rozpětím (IQR, interquartile range) v kontrolní a v CDAA-HFD skupině. Ke grafickému znázornění výsledků byl využit sloupcový graf (ke znázornění výsledků u kontrolní skupiny byl použit zelený sloupec a ke znázornění výsledků u CDAA-HFD skupiny byl použit modrý sloupec).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Vliv diety na rozvoj hepatomegalie

Na základě údajů o hmotnosti jater a hmotnosti těla v den odběru a porovnání těchto hodnot s hodnotami u kontrolní skupiny byl u CDAA-HFD skupiny odhalen rozvoj hepatomegalie. Vycházelo se ze skutečnosti, že čím větší poměr hmotnosti játra/tělo, tím je větší pravděpodobnost vzniku hepatomegalie u daných jedinců. Graf 1 ukazuje na vzrůst tohoto poměru u CDAA-HFD skupiny, to u této skupiny potvrzuje pravděpodobnou přítomnost hepatomegalie (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Výsledky zaznamenané v grafu jsou vyjádřeny v procentech jako medián hodnot poměru hmotnosti jater a hmotnosti těla s IQR.

**Graf 1 Poměr hmotnosti jater k hmotnosti těla u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny**



## 5.2. Vliv diety na rozvoj jaterního poškození

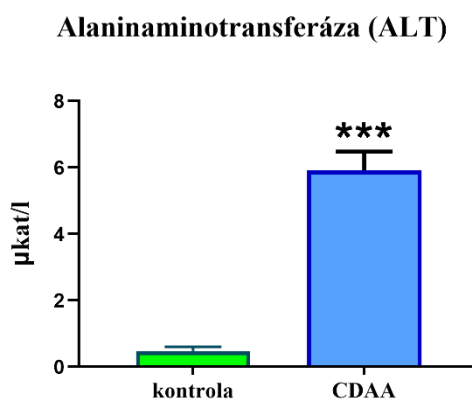
Biochemickou analýzou byly v krvi u kontrolní skupiny a u CDAA-HFD skupiny stanoveny hladiny enzymů alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) a hladiny celkového bilirubinu.

V případě ALT a AST (Graf 2 a 3) vykazovaly hladiny těchto enzymů u CDAA-HFD skupiny výrazné zvýšení v porovnání s hladinami enzymů u kontrolní skupiny, kde byly tyto hladiny enzymů pouze minimální (medián < 1  $\mu\text{kat/l}$ ); \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Výsledky zaznamenané v grafech jsou vyjádřeny v  $\mu\text{kat/l}$  jako medián hodnot hladin enzymu (ALT či AST) v plazmě s IQR.

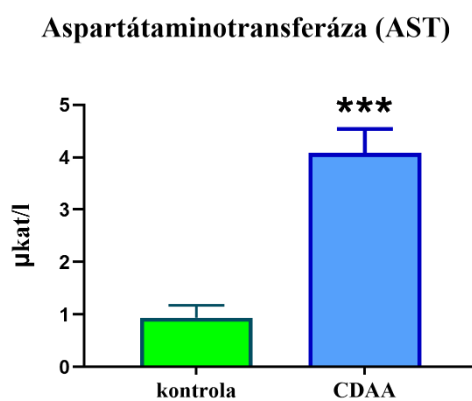
Změna hladiny celkového bilirubinu (Graf 4) u CDAA-HFD skupiny v porovnání s hladinou celkového bilirubinu u kontrolní skupiny byla výrazná již méně (\*  $p \leq 0,05$ ). Výsledky zaznamenané v grafu jsou vyjádřeny v  $\mu\text{mol/l}$  jako medián hodnot hladin celkového bilirubinu v plazmě s IQR.

Zvýšené hladiny ALT, AST i celkového bilirubinu poukazují na jaterní poškození a jsou typickými projevy NASH. U CDAA-HFD skupiny došlo k výraznému zvýšení těchto hodnot, což potvrzuje výrazné jaterní poškození, které bylo touto dietou navozeno.

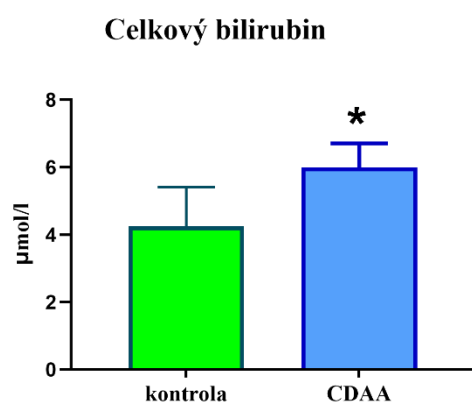
**Graf 2 Hladiny ALT u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny**



**Graf 3 Hladiny AST u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny**



**Graf 4 Hladiny celkového bilirubinu u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny**



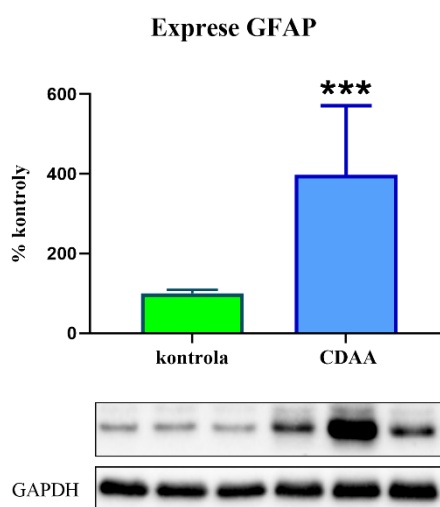
### 5.3. Vliv diety na rozvoj jaterní fibrózy

Výsledky této analýzy znázorňují expresi sledovaných proteinů ve vzorcích homogenátu jaterní tkáně s cílem zhodnotit rozdíly v expresi těchto proteinů mezi kontrolní skupinou a CDAA-HFD skupinou.

Každý z výsledků (Graf 5, 6 a 7) zahrnuje nejprve údaje v sloupcovém grafu. V něm je vidět zřetelný rozdíl v expresi vybraných proteinů v CDAA-HFD skupině v porovnání s expresí proteinů v kontrolní skupině. Všechny výsledky zaznamenané v grafech jsou vyjádřeny v procentech jako medián hodnot exprese daného proteinu s IQR v kontrolní a v CDAA-HFD skupině. Dále jsou tyto výsledky doplněny o obrazový výstup ve formě reprezentativních bandů z western blotu. Jednotlivé proužky znázorňují expresi vybraného proteinu, kdy první tři bandy jsou uvedeny pro kontrolní skupinu a zbývající tři bandy pro CDAA-HFD skupinu. Gely byly v průběhu metody naplněny ekvivalentním množstvím vzorku, resp. proteinu, což bylo potvrzeno současnou detekcí proteinu GAPDH jako vnitřní kontroly nanášky.

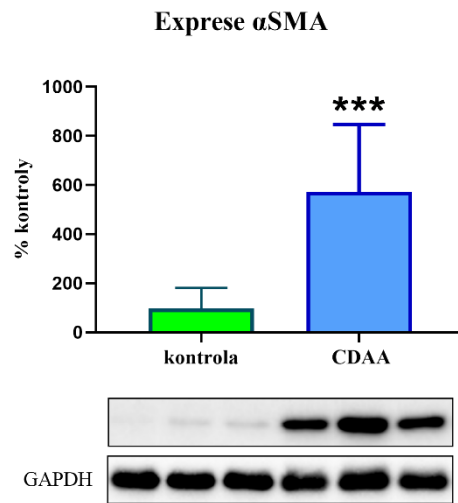
Výsledky měření prokázaly významné zvýšení exprese všech sledovaných proteinů, tj. GFAP,  $\alpha$ -SMA a Mac-2, u CDAA-HFD skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Zvýšená exprese těchto proteinů poukazuje na jaterní poškození vlivem vznikající fibrózy, mj. typické pro NASH.

**Graf 5 Expese GFAP u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny**

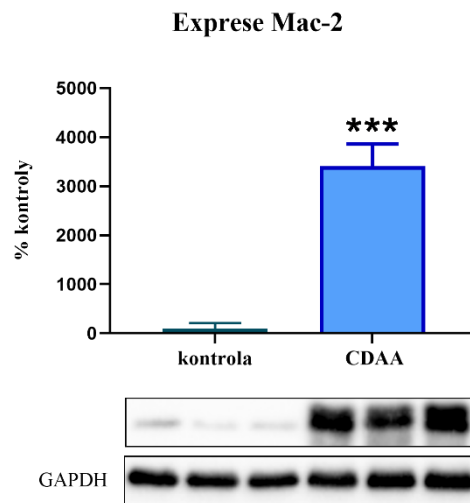




**Graf 6** Expres  $\alpha$ -SMA u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny



**Graf 7** Expres Mac-2 u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny



## 6. DISKUZE

Nealkoholická steatohepatitida (NASH) je chronické jaterní onemocnění charakterizované současným výskytem jaterní steatózy a zánětlivé reakce. Jaterní steatózu lze pozorovat běžnými zobrazovacími metodami, zatímco NASH je možné diagnostikovat až na základě histologického vyšetření. Proto je často jaterní biopsie brána jako tzv. „zlatý standard“ v diagnostice NASH (Brůha, 2019). Nicméně se jedná o invazivní vyšetření, a proto je úsilím moderní medicíny zavést do praxe neinvazivní metody, které by byly schopny spolehlivě potvrdit toto onemocnění.

Rutinně se jaterní poškození hodnotí pomocí biochemických markerů. Jsou jimi enzymy ALT (alaninaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza) a celkový bilirubin. Rozvoj jaterního poškození nám může rovněž napovědět přítomnost hepatomegalie. Za velice přínosná v diagnostice jaterního poškození by se mohla považovat ale i ostatní vyšetření, jako je stanovení celkové bílkoviny, albuminu či protrombinového času. V souvislosti s NASH se nabízí také stanovení triacylglycerolů a cholesterolu a jeho frakcí (Lukáš, 2022).

V důsledku chronického postižení jaterního parenchymu dochází ke vzniku jaterní fibrózy. Fibróza je definovaná jako nadměrné ukládání extracelulární hmoty ve tkáni, které vede ke strukturálním a funkčním změnám jater. Fibrogenese je nezbytná pro obnovu tkáně. Pro pacienty s chronickým jaterním postižením je rozvoj fibrózy a její rozsah klíčovým prognostickým faktorem. Hlavním producentem extracelulární hmoty jsou aktivované hvězdčité buňky. Hvězdčité buňky se vyskytují v Disseho prostoru, tj. prostoru mezi hepatocyty a sinusoidami. Toto umístění je výhodné v jejich komunikaci s imunitním systémem (Šmíd, 2020). Hvězdčité buňky se během chronického postižení jater mění z klidového stádia v aktivované (Hoffmann, 2020).

Nejrůznější studie se věnují možnostem nalezení markerů, které by hvězdčité buňky svým výskytem definovaly, a to zejména v souvislosti s rozvojem jaterní fibrózy. Jedním z nejpoužívanějších markerů k detekci aktivovaných hvězdčitých buněk je  $\alpha$ -SMA.  $\alpha$ -SMA je hlavní složkou hladkého svalstva cév (Gao, 2017) a  $\alpha$ -SMA stresová vlákna jsou charakteristickým znakem myofibroblastů (Hillsley, 2021). Hoffmannová (2020), která využila fluorescenční detekci, ve své práci uvedla přítomnost  $\alpha$ -SMA pouze v oblasti žilního parenchymu u myši krmených standardní dietou a přítomnost  $\alpha$ -SMA v celém parenchymu u

myši s CDAA-HFD dietou. Tím potvrzuje souvislost  $\alpha$ -SMA s aktivací myofibroblastů. Současně s těmito pozorováními byla v této práci zjištěna četná tvorba shluků aktivovaných hvězdicovitých buněk v poškozeném parenchymu.

Rovněž GFAP je exprimován hvězdicovitými buňkami. Je markerem klidových hvězdicovitých buněk a markerem jejich časně aktivace (Gupta, 2019). Zároveň se zdá být vhodnější pro detekci časně aktivace hvězdicovitých buněk než  $\alpha$ -SMA (Hassan, 2014). GFAP se během jaterní fibrózy zřejmě účastní remodelace vaskulatury poškozené tkáně (Gupta, 2019; Sufletel, 2020). Některé zdroje potvrzují zvýšenou expresi GFAP v akutní fázi poranění a jeho následné snížení ve fázi chronické (Carotti, 2008), jiné naopak uvádí, že exprese GFAP koreluje s progresí jaterního poškození (Kim, 2018).

Mac-2, dnes ve většině studií označovaný jako galectin-3, je neglykosylovaný lektin, u něž se nejvíce zabýváme jeho prozánětlivými a profibrotickými vlastnostmi (Franecková, 2022). Účastní se aktivace myofibroblastů a jeho profibrotické vlastnosti spočívají v tvorbě oligomerů a jejich zesíťování do mřížkovité struktury (Kram, 2023). Sciacchitano (2018) naznačuje, že lze galectin-3 považovat za užitečný marker pro predikci tkáňové fibrózy.

Vzhledem k výše uvedeným poznatkům byla v této práci hodnocena míra exprese vybraných proteinů charakterizujících fibrózu, tj. GFAP,  $\alpha$ -SMA a Mac-2, v jaterní tkáni. Cílem této práce bylo sledovat vliv specifického dietního opatření na vznik jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy u myšího modelu. K tomu byla využita dieta CDAA-HFD, která se obecně jeví jako velice vhodný nástroj pro indukci NASH. Do tohoto experimentu byla zařazena skupina 9týdenních myších samců kmene C57BL/6J, kteří byli na začátku experimentu nezávisle rozděleni do dvou skupin: kontrolní skupina (n=6) a CDAA-HFD skupina (n=8). Kontrolní skupina byla po dobu 4 týdnů krmena standardní laboratorní dietou (chow diet), zatímco sledovaná skupina dietou CDAA-HFD.

Na základě zjištěné hmotnosti jater a hmotnosti těla byl v tomto experimentu u CDAA-HFD skupiny vyhodnocen vznik hepatomegalie, který přímo ukazuje na jaterní poškození. Rovněž bylo toto poškození zjištěno také na základě biochemické analýzy, která odhalila vysoké hladiny enzymů ALT, AST a vyšší hladiny celkového bilirubinu u CDAA-HFD skupiny. V poslední řadě byla využita metoda western blot ke zjištění exprese vybraných proteinů charakteristických pro jaterní fibrózu. Byl vybrán GFAP,  $\alpha$ -SMA a Mac-2. Stejně jako vznik hepatomegalie a zvýšené hodnoty jaterních enzymů a celkového bilirubinu

v biochemické analýze, i v tomto případě byl potvrzen předpokládaný významný vzrůst exprese vybraných proteinů u CDAA-HFD skupiny, a tím byl potvrzen vliv dietního opatření CDAA-HFD na vznik jaterní fibrózy.

Výsledky našeho experimentu, které odhalily morfologické změny (hepatomegalie), změny jaterních funkcí (zvýšené jaterní enzymy) a rozvoj fibrózy v jaterní tkáni (markery fibrogenese) jsou zcela ve shodě s výsledky jiných studií (Hoffmanová, 2020; Rokugawa, 2018; Ikawa-Yoshida, 2017; Moon, 2018; Henderson, 2006; de Oliveira, 2019; Zakaria, 2010; Sun, 2022).

## 7. ZÁVĚR

Nealkoholická steatohepatitida je chronické jaterní onemocnění, které má úzkou vazbu na metabolický syndrom. Jelikož za rizikové faktory pro rozvoj NASH je považován diabetes mellitus 2. typu, obezita a hypertenze, je patrný její vztah ke kardiovaskulárním chorobám obecně. Úsilím moderní medicíny je mj. spolehlivá a včasná diagnostika. Hledají se tedy vhodné specifické markery změn v průběhu tohoto onemocnění, k čemuž s výhodou slouží výzkum na zvířecích modelech.

Výsledky experimentu v této práci potvrzují, že dieta CDAA-HFD je dobrou volbou pro navození jaterního poškození charakteru NASH, a to již po 4 týdnech podávání u myšního modelu. Tento experimentální model se pak stává vhodným výchozím bodem pro další studium jaterního poškození charakteru nealkoholické steatohepatitidy, včetně možných terapeutických zásahů.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>Zkratka</b>	<b>Význam zkratky</b>
ALT	alanin aminotransferase (alaninaminotransferáza)
APS	ammonium persulphate (peroxodisíran amonný)
$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle actin (alfa aktin hladkého svalstva)
AST	aspartate aminotransferase (aspartátaminotransferáza)
BCA	bicinchinonic acid (bicinchoninová kyselina)
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CAF	cancer associated fibroblast (fibroblast spojený s rakovinou)
CDAА-HFD	choline-deficient L-amino acid defined high fat diet
CT	computed tomography (počítačová tomografie)
DAMP	danger-associated molecular pattern (vzory vnitřního poškození)
ENS	enteric nervous system (enterická nervová soustava)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)
GFAP	glial fibrillary acidic protein (gliální vláknitý kyselý protein)
GFAP-BDPs	GFAP breakdown products (produkty rozpadu GFAP)
H&E	hematoxylin a eosin
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatocelulární karcinom)
IBD	inflammatory bowel disease (idiopatické střevní onemocnění)
IQR	interquartile range (mezikvartilové rozpětí)
M2BPGi	mac-2 binding protein glycosylation isomer (glykosylovaný izomer proteinu vázající Mac-2)
M2BP	mac-2 binding protein (protein vázající Mac-2)
MMP	matrix metalloproteinase (matrix metaloproteináza)
MMP-9	matrix metalloproteinase 9 (matrix metaloproteináza 9)
MW	molecular weight (molekulová hmotnost)
NAFL	non-alcoholic fatty liver
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease (nealkoholické tukové postižení jater)

<b>Zkratka</b>	<b>Význam zkratky</b>
NASH	nonalcoholic steatohepatitis (nealkoholická steatohepatitida)
PDGF	platelet derived growth factor (růstový faktor z destiček)
PDI	protein disulfide-isomerase (protein disulfid izomeráza)
PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (protein obsahující fosfolipázovou doménu podobnou patatinu)
PNS	peripheral nervous systém (periferní nervový systém)
PVDF	polyvinylidene difluoride (polyvinylidendifluoridová membrána)
SDS	sodium-dodecyl sulphate (dodecylsírán sodný)
TAAD	thoracic aortic aneurysm and dissection (aneurysma hrudní aorty s disekcí aorty)
TBS	tris buffer saline (Tris-pufr)
TEMED	tetramethylethyldiamin
TGF- $\alpha$	transforming growth factor alpha (transformující růstový faktor alfa)
TGF- $\beta$ -1	transforming growth factor beta-1 (transformující růstový faktor beta-1)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha (tumor nekrotizující faktor alfa)
VLDL	very-low density lipoprotein (lipoprotein s velmi nízkou hustotou)
VSMCs	vaskular smooth muscle cells (buňky hladkého svalstva cév)

## SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Makroskopický obraz jater</i>	<i>10</i>
<i>Obrázek 2 Schéma stavby jaterního lalůčku</i>	<i>11</i>
<i>Obrázek 3 Funkce jater</i>	<i>13</i>
<i>Obrázek 4 Progrese NAFLD</i>	<i>15</i>
<i>Obrázek 5 Histologické řezy jaterní biopsie pacienta s NASH</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 6 Histologie zdravé, fibrotické a cirhotické jaterní tkáně</i>	<i>19</i>
<i>Obrázek 7 Hvězdicovité buňky</i>	<i>20</i>
<i>Obrázek 8 Vliv CDAA-HFD diety na histologii jater</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek 9 Přehled postupu pro metodu western blot</i>	<i>31</i>



## SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

<i>Tabulka 1 Složení separačních gelů</i>	37
<i>Tabulka 2 Složení zaostřovacího gelu</i>	37
<i>Tabulka 3 Parametry pro nastavení elektroforetických podmínek pro 2 gely</i>	39
<i>Tabulka 4 Parametry pro nastavení podmínek pro přenos proteinů</i>	40
<i>Tabulka 5 Primární protilátky a jejich ředění</i>	41
<i>Tabulka 6 Sekundární protilátky a jejich ředění</i>	41
<i>Tabulka 7 Volba detekčního roztoku a délka jeho inkubace</i>	42

## SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ

<i>Graf 1 Poměr hmotnosti jater k hmotnosti těla u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>44</i>
<i>Graf 2 Hladiny ALT u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>45</i>
<i>Graf 3 Hladiny AST u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>46</i>
<i>Graf 4 Hladiny celkového bilirubinu u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>46</i>
<i>Graf 5 Exprese GFAP u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>47</i>
<i>Graf 6 Exprese <math>\alpha</math>-SMA u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>48</i>
<i>Graf 7 Exprese Mac-2 u kontrolní skupiny a CDAA-HFD skupiny</i>	<i>48</i>

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABCAM. Protokol Western blot. *Abcam* [online]. 2020 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol>

ALMEIDA-SUHETT, Camila P., Jonathan M. SCOTT, Alice GRAHAM, et. al. Control diet in a high-fat diet study in mice: Regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes. *Nutritional Neuroscience* [online]. 2019, **22**(1), 19-28 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1028-415X. Dostupné z: doi:10.1080/1028415X.2017.1349359

AN, Dong, Jonathan CHUNG-WAH-CHEONG, Dao-Yi YU a Chandrakumar BALARATNASINGAM. Alpha-smooth muscle actin expression and parafoveal blood flow pathways are altered in preclinical diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2022, **63**(5) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.63.5.8

BARIA. ELISA, Multiplex array, Western blot a RIA - která metoda je „ta pravá“?. *Baria* [online]. 2022 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc6189241-elisa-multiplex-array-western-blot-a-ria-ktera-metoda-je-ta-prava>

BELOVIČOVÁ, Mária. *Dieta u jaterních onemocnění*. Praha: Forsapi, 2015, 114 s. ISBN 978-80-87250-26-6.

BRŮHA, Radan. Non-alcoholic fatty liver disease. *Vnitřní lékařství* [online]. 2019, **65**(9), 571-575 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0042773X. Dostupné z: doi:10.36290/vnl.2019.098

BU, Luke, Hideo BABA, Naoya YOSHIDA, et. al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* [online]. 2019, **38**(25), 4887-4901 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-019-0765-y

BUREŠ, Jan a Jiří HORÁČEK. *Základy vnitřního lékařství*. Praha: Galén, 2003, 870 s. ISBN 80-726-2208-0.

BUREŠ, Jan, Jiří HORÁČEK a Jaroslav MALÝ. *Vnitřní lékařství*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, 2014, 538 s. ISBN 978-80-7492-145-2.

CAROTTI, Simone, Sergio MORINI, Stefano Ginanni CORRADINI, et al. Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transplantation* [online]. 2008, **14**(6), 806-814 [cit. 2023-04-05]. ISSN 15276465. Dostupné z: doi:10.1002/lt.21436

CHEN, Jingbo, Yan ZHOU, Shuying LIU a Chaohong LI. Biomechanical signal communication in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cell Communication and Signaling* [online]. 2020, **14**(4), 357-376 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1873-9601. Dostupné z: doi:10.1007/s12079-020-00576-1

ČIHÁK, Radomír. *Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2004, 470 s. ISBN 80-247-0143-X.

CORTÉS-RÍOS, Javiera, Ana María ZÁRATE, Juan David FIGUEROA, et al. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, **608** [cit. 2023-03-17]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113904

DE OLIVEIRA, Felipe Leite, Nadia PANERA, Cristiano DE STEFANIS, et al. The number of liver galectin-3 positive cells is dually correlated with nafld severity in children. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(14) [cit. 2023-04-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20143460

DISTEFANO, Johanna K. NAFLD and NASH in postmenopausal women: Implications for diagnosis and treatment. *Endocrinology* [online]. 2020, **161**(10) [cit. 2023-03-16]. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/endocr/bqaa134

ENGELMANN, Cornelius a Frank TACKE. The potential role of cellular senescence in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(2) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23020652

EHRMANN, Jiří a Petr HŮLEK. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2010, 590 s. ISBN 978-80-247-3118-6.

EHRMANN, Jiří, Květoslava AIGLOVÁ, Drahomíra VRZALOVÁ, et. al. Mimojaterní projevy NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease, nealkoholové postižení jater při steatóze). Jde o příčinnou souvislost?. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2017, **19**(2), 72-77 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2017/02/06.pdf>

EL-AZIZ, Rokaya, Alshaimaa ALNAGGAR, Mona NABIH, et. al. Mac-2 binding protein in non-alcoholic fatty liver disease: Is it a reliable diagnostic biomarker? A pilot study. *Clinical and Experimental Hepatology* [online]. 2020, **6**(1), 28-34 [cit. 2023-03-14]. ISSN 2392-1099. Dostupné z: doi:10.5114/ceh.2020.93053

EZHILARASAN, Devaraj. Unraveling the pathophysiologic role of galectin-3 in chronically injured liver. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2023 (vydáno online před tiskem) [cit. 2023-04-12]. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.30956

FRANEKOVA, Janka a Antonín JABOR. Galectin-3: patofyziologie, analytické charakteristiky, interpretační meze a biologická variabilita. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2022, **30**(3), 68-72 [cit. 2023-04-09]. ISSN 2570-9402. Dostupné z: [https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2022/12/KBM\\_3\\_2022\\_Franekova-68.pdf](https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2022/12/KBM_3_2022_Franekova-68.pdf)

FRIEDMAN, Scott L. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2004, **1**(2), 98-105 [cit. 2023-03-16]. ISSN 1743-4378. Dostupné z: doi:10.1038/ncpgasthep0055

GAO, Yuansheng. *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation*. Singapore: Springer Nature, 2017, 286 s. ISBN 978-981-10-4809-8.

GUPTA, Gaurav, Forough KHADEM a Jude E. UZONNA. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine* [online]. 2019, **124** [cit. 2023-04-05]. ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/j.cyto.2018.09.004

HASSAN, Sobia, Serajuddaula SYED a Shahnaz Imdad KEHAR. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a mesenchymal marker of early hepatic stellate cells activation in liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Pakistan Journal of Medical Sciences* [online]. 2014, **30**(5), 1027-1032 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1681-715X. Dostupné z: doi:10.12669/pjms.305.5534

HEIMFARTH, Luana, Fabiolla Rocha Santos PASSOS, Brenda Souza MONTEIRO, et. al. Serum glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker: A valuable prognostic for neurological disease – A systematic review. *International Immunopharmacology* [online]. 2022, **107** [cit. 2023-03-14]. ISSN 15675769. Dostupné z: doi:10.1016/j.intimp.2022.108624

HENDERSON, Neil C., Alison C. MACKINNON, Sarah L. FARNWORTH, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, **103**(13), 5060-5065 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0511167103

HILLSLEY, Alexander, Javier E. SANTOS a Adrienne M. ROSALES. A deep learning approach to identify and segment alpha-smooth muscle actin stress fiber positive cells. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2023-03-14]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-01304-4

HLOŽKOVÁ, Jana, Veronika JURAČKOVÁ, Pavel SUCHÝ, et. al. Stručná analýza četnosti použití a spektra animálních modelů ve výzkumu cévních mozkových příhod. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2019, **82**(3), 274-278 [cit. 2023-03-14]. ISSN 12107859. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2019274

HNASKO, Thomas S. a Robert M. HNASKO. The Western Blot. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2015, **1318**, 87-96 [cit. 2023-05-06]. ISBN 978-1-4939-2741-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2742-5\_9

HOFFMANN, Céline, Nour El Houda DJERIR, Anne DANCKAERT, et al. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-60615-0

HOL, Elly M. a Milos PEKNY. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2015, **32**, 121-130 [cit. 2023-03-14]. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2015.02.004

HOL, M. K. a T. A. SPRINGER. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* [online]. 1982, **128**(3), 1221-1228 [cit. 2023-04-15]. ISSN 1550-6606.

HORÁK, Jiří a Jiří EHRMANN. *Hepatologie do kapsy*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3299-5.

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

HULÍN, Ivan. *Patofyziologie*. 10. vydání. Bratislava: ProLitera, 2020. ISBN 978-80-89668-07-6.

IBRAHIM, Samar H., Petra HIRSOVA, Harmeet MALHI a Gregory J. GORES. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, delete, and inflame. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 2016, **61**(5), 1325-1336 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0163-2116. Dostupné z: doi:10.1007/s10620-015-3977-1

IKAWA-YOSHIDA, Ayae, Saori MATSUO, Atsuhiko KATO, et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *International Journal of Experimental Pathology* [online]. 2017, **98**(4), 221-233 [cit. 2023-04-04]. ISSN 09599673. Dostupné z: doi:10.1111/iep.12240

JOCKUSCH, Brigitte M.. *The Actin Cytoskeleton*. Braunschweig: Springer International Publishing, 2017, 349 s. ISBN 978-3-319-46369-8.

KARANJIA, Rustam N., Mary M. E. CROSSEY, I. Jane COX, et. al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(45) [cit. 2023-03-16]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i45.9880

KIM, Sung-Eun, Ji Won PARK, Mo-Jong KIM, et al. Accumulation of citrullinated glial fibrillary acidic protein in a mouse model of bile duct ligation-induced hepatic fibrosis. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(8) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0201744

KISSELEVA, Tatiana. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver. *Hepatology* [online]. 2017, **65**(3), 1039-1043 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.28948

KIYOAKI, Ito, Yoshio SUMIDA, Yukiomi NAKADE, et al. Mac-2 binding protein glycosylation isomer, the FIB-4 index, and a combination of the two as predictors of non-alcoholic steatohepatitis. *PLOS ONE* [online]. 2022, **17**(11) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0277380

KRAM, Michael. Galectin-3 inhibition as a potential therapeutic target in non-alcoholic steatohepatitis liver fibrosis. *World Journal of Hepatology* [online]. 2023, **15**(2), 201-207 [cit. 2023-04-15]. ISSN 1948-5182. Dostupné z: doi:10.4254/wjh.v15.i2.201

KROON, Cristina, Larissa BREUER, Lydia JONES, et al. Blind spots on western blots: Assessment of common problems in western blot figures and methods reporting with recommendations to improve them. *PLOS Biology* [online]. 2022, **20**(9) [cit. 2023-03-20]. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.3001783

KOGA, Masaaki, Mizuki KURAMOCHI, Mohammad Rabiul KARIM, et. al. Immunohistochemical characterization of myofibroblasts appearing in isoproterenol-induced rat myocardial fibrosis. *Journal of Veterinary Medical Science* [online]. 2019, **81**(1), 127-133 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0916-7250. Dostupné z: doi:10.1292/jvms.18-0599

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012, 512 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

LAHODA BRODSKÁ, Helena a Pavel KOHOUT. *Laboratorní vyšetření v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-3243-0.

LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009, 320 s. ISBN 978-80-247-2526-0.

LATA, Jan a Tomáš VAŇÁSEK. *Kritické stavy v hepatologii*. Praha: Grada, 2005, 168 s. ISBN 80-247-0404-8.

LAU, Jennie Ka Ching, Xiang ZHANG a Jun YU. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology* [online]. 2017, **241**(1), 36-44 [cit. 2023-03-16]. ISSN 00223417. Dostupné z: doi:10.1002/path.4829

LI, Dongyang, Xiaoyu LIU, Tianming LIU, et. al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia* [online]. 2020, **68**(5), 878-897 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.23734

LINO CARDENAS, Christian L., Chase W. KESSINGER, Yisha CHENG, et al. An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2023-03-14]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-03394-7

LU, Ying, Xiaolan SU, Manyu ZHAO, et al. Comparative RNA-sequencing profiled the differential gene expression of liver in response to acetyl-CoA carboxylase inhibitor GS-0976 in a mouse model of NASH. *PeerJ* [online]. 2019, **7** [cit. 2023-04-04]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.8115

LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Gastroenterologie a hepatologie: učebnice*. Praha: Grada, 2007, 380 s. ISBN 978-80-247-1787-6.

LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika : 232 znaků, příznaků a laboratorních ukazatelů ve 190 kapitolách s epilogem. 2., přepracované a aktualizované vydání*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-2576-0.

LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. překlad 3. vydání. Praha: Grada, 2012, 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4.

LURIE, Yoav. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2015, **21**(41) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v21.i41.11567

MAHMOOD, Tahrin a Ping-Chang YANG. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **4**(9), 429-34 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1947-2714. Dostupné z: doi:10.4103/1947-2714.100998

MAK, Lung-Yi, Michael KO, Elvis TO, et al. Serum Mac-2-binding protein glycosylation isomer and risk of hepatocellular carcinoma in entecavir-treated chronic hepatitis B patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2019, **34**(10), 1817-1823 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0815-9319. Dostupné z: doi:10.1111/jgh.14637

MALEČKOVÁ, A., Z. TONAR, P. MIK, et al. Zvířecí modely jaterních onemocnění a jejich využití v experimentální chirurgii. *Rozhledy v chirurgii* [online]. 2019, **98**(3), 100-109 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1805-4579. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/rozhledy-v-chirurgii/2019-3/zvireci-modely-jaternich-onemocneni-a-jejich-vyuziti-v-experimentalni-chirurgii-109398>

MANNHERZ, Hans Georg. *The Actin Cytoskeleton and Bacterial Infection*. Bochum: Springer International Publishing, 2017, 242 s. ISBN 978-3-319-50046-1.

MAREŠ, Jan. *Úvod do preklinické medicíny*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, 2013, 168 s. ISBN 978-80-87878-02-6.

MARIOTTI, Valeria, Mario STRAZZABOSCO, Luca FABRIS a Diego F. CALVISI. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2018, **1864**(4), 1254-1261 [cit. 2023-03-14]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2017.06.027

MASSETT, M. P., B. C. BYWATERS, H. C. GIBBS, et al. Loss of smooth muscle  $\alpha$ -actin effects on mechanosensing and cell–matrix adhesions. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2020, **245**(4), 374-384 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/1535370220903012

MATSUMOTO, Masahiko, Natsuko HADA, Yoshiyuki SAKAMAKI, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal of Experimental Pathology* [online]. 2013, **94**(2), 93-103 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0959-9673. Dostupné z: doi:10.1111/iep.12008

MISHRA, Manish, Shuchita TIWARI a Aldrin V. GOMES. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics* [online]. 2017, **14**(11), 1037-1053 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1478-9450. Dostupné z: doi:10.1080/14789450.2017.1388167



MOON, Hee-Won, Mikyoung PARK, Mina HUR, et al. Usefulness of enhanced liver fibrosis, glycosylation isomer of Mac-2 binding protein, Galectin-3, and soluble suppression of tumorigenicity 2 for assessing liver fibrosis in chronic liver diseases. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 2018, **38**(4), 331-337 [cit. 2023-04-12]. ISSN 2234-3806. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2018.38.4.331

MUCHLIŃSKA, Anna, Anna NAGEL, Marta POPEŃDA, et al. Alpha-smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts secreting osteopontin promote growth of luminal breast cancer. *Cellular & Molecular Biology Letters* [online]. 2022, **27**(1) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1425-8153. Dostupné z: doi:10.1186/s11658-022-00351-7

NAGAOKA, Katsuya, Motohiko TANAKA a Yasuhito TANAKA. Mac-2 binding protein and its glycan isomer: Where does it come from? Where is it going?. *Hepatology Research* [online]. 2021, **51**(10), 1026-1028 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1386-6346. Dostupné z: doi:10.1111/hepr.13697

NAH, Eun-Hee, Seon CHO, Suyoung KIM, et al. Diagnostic performance of Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) in screening liver fibrosis in health checkups. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2020, **34**(8) [cit. 2023-03-14]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.23316

PARK, Hyun Joon, Kwang Il SEO, Sang Uk LEE, et al. Clinical usefulness of Mac-2 binding protein glycosylation isomer for diagnosing liver cirrhosis and significant fibrosis in patients with chronic liver disease: A retrospective single-center study. *Medicine* [online]. 2022, **101**(40) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1536-5964. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000030489

PELLIZZON, Michael. Choice of laboratory animal diet influences intestinal health. *Lab Animal* [online]. 2016, **45**(6), 238-239 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0093-7355. Dostupné z: doi:10.1038/labani.1014

PEJNOVIC, Nada, Ilija JEFTIC, Nemanja JOVICIC, et al. Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **22**(44) [cit. 2023-04-14]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v22.i44.9706

PETZOLD, Axel. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Research* [online]. 2015, **1600**, 17-31 [cit. 2023-03-14]. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2014.12.027

PING, Suning, Shuying LIU, Yuhuan ZHOU, et al. Protein disulfide isomerase-mediated apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stress and advanced glycosylation end products result in diabetic mouse vein graft atherosclerosis. *Cell Death & Disease* [online]. 2017, **8**(5) [cit. 2023-03-14]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2017.213

PUGLIESE, G., C. IACOBINI, C. M. PESCE a S. MENINI. Galectin-3: an emerging all-out player in metabolic disorders and their complications. *Glycobiology* [online]. 2015, **25**(2), 136-150 [cit. 2023-04-14]. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwu111

ROKUGAWA, Takemi, Haruyo KONISHI, Miwa ITO, et al. Evaluation of hepatic integrin  $\alpha\beta_3$  expression in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mouse by  $^{18}\text{F}$ -FPP-RGD<sub>2</sub> PET. *EJNMMI Research* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2191-219X. Dostupné z: doi:10.1186/s13550-018-0394-4

SCIACCHITANO, Salvatore, Luca LAVRA, Alessandra MORGANTE, et al. Galectin-3: One molecule for an alphabet of diseases, from A to Z. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(2) [cit. 2023-04-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19020379

SHIRABE, Ken, Yuki BEKKI, Dolgormaa GANTUMUR, et. al. Mac-2 binding protein glycan isomer (M2BPGi) is a new serum biomarker for assessing liver fibrosis: more than a biomarker of liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, **53**(7), 819-826 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0944-1174. Dostupné z: doi:10.1007/s00535-017-1425-z

ŠMÍD, Václav. Jaterní fibróza. *Vnitřní lékařství* [online]. 2020, **66**(4), 36-41 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0042773X. Dostupné z: doi:10.36290/vnl.2020.078

ŠPIČÁK, Julius. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. Praha: Grada, 2008, 420 s. ISBN 978-802-4717-838.

STEWART, Rachel. Western Blotting. *Antibodies* [online]. 2015-2023 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://www.antibodies.com/es/western-blotting>

SUFLEȚEL, Rada-Teodora, Carmen Stanca MELINCOVICI, Bogdan-Alexandru GHEBAN, et al. Hepatic stellate cells – from past till present: morphology, human markers, human cell lines, behavior in normal and liver pathology. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* [online]. 2020, **61**(3), 615-642 [cit. 2023-04-16]. ISSN 12200522. Dostupné z: doi:10.47162/RJME.61.3.01

SUGASAWA, Takehito, Seiko ONO, Masato YONAMINE, et al. One week of CDAHFD induces steatohepatitis and mitochondrial dysfunction with oxidative stress in liver. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(11) [cit. 2023-04-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22115851

SUMIDA, Yoshio a Masashi YONEDA. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, **53**(3), 362-376 [cit. 2023-04-15]. ISSN 0944-1174. Dostupné z: doi:10.1007/s00535-017-1415-1

SUN, MengJiao, Ning LIU, QinFang XIE, et. al. A candidate biomarker of glial fibrillary acidic protein in CSF and blood in differentiating multiple sclerosis and its subtypes: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* [online]. 2021, **51** [cit. 2023-03-14]. ISSN 22110348. Dostupné z: doi:10.1016/j.msard.2021.102870

SUN, Tian-tian, Xu-ling LIU, Guang-yue YANG, et al. Neurotrophic factors stimulate the activation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2022, **630**, 167-174 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2022.09.025

TAMAKI, Nobuharu, Masayuki KUROSAKI, Rohit LOOMBA a Namiki IZUMI. Clinical Utility of Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer in Chronic Liver Diseases. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 2021, **41**(1), 16-24 [cit. 2023-03-14]. ISSN 2234-3806. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2021.41.1.16

TAO, Leilei, Guichun HUANG, Haizhu SONG, et al. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncology Letters* [online]. 2017, **14**(3), 2611-2620 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2017.6497

TAYLOR, Sean C., Thomas BERKELMAN, Geetha YADAV a Matt HAMMOND. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology* [online]. 2013, **55**(3), 217-226 [cit. 2023-03-17]. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-013-9672-6

TAYLOR, Sean C. a Anton POSCH. The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014** [cit. 2023-05-06]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/361590

TIE, Lu, Han XIAO, Da-lei WU, et al. A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. *Acta Pharmacologica Sinica* [online]. 2021, **42**(7), 1015-1017 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/s41401-020-00539-7

TRABER, Peter G., Hsin CHOU, Eliezer ZOMER, et al. Regression of Fibrosis and Reversal of Cirrhosis in Rats by Galectin Inhibitors in Thioacetamide-Induced Liver Disease. *PLOS ONE* [online]. 2013, **8**(10) [cit. 2023-04-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0075361

VALIHRACH, Lukáš a Zuzana BENEŠOVÁ. Mezinárodní vědecké konsorcium pracuje na objasnění mechanismu ultra-vzácné Alexandrovovy choroby [online]. 2021 [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: <https://www.biocev.eu/cs/o-nas/aktuality/mezinardni-vedecke-konsorciem-pracuje-na-objasneni-mechanismu-ultra-vzacne-alexandrovovy-choroby.305>

WANG, Jin, Wanping HE, Ping-Ju TSAI, et al.. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2020, **19**(1) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1476-511X. Dostupné z: doi:10.1186/s12944-020-01210-0

WEI, Guangyan, Ping AN, Kahini A. VAID, et al. Comparison of murine steatohepatitis models identifies a dietary intervention with robust fibrosis, ductular reaction, and rapid progression to cirrhosis and cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 2020, **318**(1), G174-G188 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00041.2019

YAMADA, Naoya, Takumi KATANO, Yuta HIRATA, et al. Serum Mac-2 binding protein glycosylation isomer predicts the activation of hepatic stellate cells after liver transplantation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2019, **34**(2), 418-424 [cit. 2023-03-14]. ISSN 08159319. Dostupné z: doi:10.1111/jgh.14438

YANG, Zhihui a Kevin K.W. WANG. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences* [online]. 2015, **38**(6), 364-374 [cit. 2023-03-14]. ISSN 01662236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2015.04.003

YUAN, Shi-Min. A-smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* [online]. 2015, **30**(6), 644-649 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0102-7638. Dostupné z: doi:10.5935/1678-9741.20150081

ZAKARIA, Sohier, Magdy YOUSSEF, Mona MOUSSA, et al. Clinical research value of  $\alpha$ -smooth muscle actin and glial fibrillary acidic protein in predicting early hepatic fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Archives of Medical Science* [online]. 2010, **3**(6), 356-365 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2010.14255

ZHANG, Zongqi, Yizhu CHEN, Tiantian ZHANG, et. al. Role of myoendothelial gap junctions in the regulation of human coronary artery smooth muscle cell differentiation by laminar shear stress. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2016, **39**(2), 423-437 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1015-8987. Dostupné z: doi:10.1159/000445636