

# Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Bakalářská práce

## **Vliv M1043 na expresi markerů zánětu u myšího modelu NASH – imunohistochemická analýza**

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

Hradec Králové, 2024

Eliška Hušková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

.....

podpis studenta

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a podporu při vypracovávání této práce.

## **Abstrakt**

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

**Katedra:** Katedra biologických a lékařských věd

**Studijní obor:** Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

**Autor:** Eliška Hušková

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

**Název práce:** Vliv M1043 na expresi markerů zánětu u myšního modelu NASH – imunohistochemická analýza

Úvod a cíl práce: Játra jsou orgánem s mnoha důležitými funkcemi v těle, jako je například detoxikace a regulace lipidového metabolismu. Poruchy v těchto procesech mohou vést k nealkoholové steatohepatidě (NASH), onemocnění spojenému s obezitou a metabolickým syndromem, charakterizovanému zánětem a nahromaděním tukových kapének v játrech. Studie zaměřené na NASH jsou důležité pro pochopení patofyziologie a vývoj nových léčebných strategií. Využití myších modelů umožňuje zkoumat patogenezu a testovat terapeutické přístupy. Tato studie zkoumá vliv anti-endoglinové protilátky M1043 na expresi zánětlivých markerů u myšního modelu NASH.

Metodika: Myši byly krmeny dietou vyvolávající NASH a rozděleny do dvou skupin, jedné s aplikovanou potkaní protilátkou IgG a druhé s anti-endoglinovou protilátkou M1043. Játra byla odebrána a zpracována pomocí imunohistochemické analýzy.

Výsledky a závěr: Výsledky této studie jsou důležité pro pochopení účinku anti-endoglinové protilátky na zánětlivé procesy v játrech postižených NASH a mohou přispět k identifikaci nových terapeutických cílů. Naše výsledky ukazují, že vysokotuková dieta způsobila steatózu v hepatocytech a zánět v jaterní tkáni. Barvení potvrdilo přítomnost sledovaných markerů ICAM-1 a galektin-3, ale při porovnání skupin s aplikací IgG a M1043 jsme nezaznamenali zásadní změny v rozsahu a intenzitě barevné reakce. Tyto závěry naznačují, že M1043 pravděpodobně neovlivňuje zánět u NASH.

**Klíčová slova:** játra, NASH, Kupfferovy buňky, jaterní hvězdicovité buňky, zánětlivé markery, imunohistochemie

## **Abstract**

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

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

**Study program:** Laboratory diagnostics in healthcare

**Author:** Eliška Hušková

**Supervisor:** RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

**Title of thesis:** The impact of M1043 on the expression of inflammatory markers in a mouse model of NASH – immunohistochemical analysis

Introduction and aim of the study: The liver is an organ with many important functions in the body, such as detoxification and regulation of lipid metabolism. Impairment of these processes can lead to NASH, a disease associated with obesity and metabolic syndrome, characterized by inflammation and accumulation of fat droplets in the liver. Studies focused on NASH are important for understanding the pathophysiology and developing new therapeutic strategies. The use of mouse models allows the investigation of pathogenesis and testing of different therapeutic approaches. This study examines the effect of the anti-endoglin antibody M1043 on the expression of inflammatory markers in a mouse model of NASH.

Methodology: Mice were fed a diet inducing NASH and divided into two groups, one receiving rat IgG antibody and the other one, receiving the anti-endoglin antibody M1043. The livers were collected and processed using immunohistochemical analysis.

Results and conclusion: The results of this study are important for understanding the effect of the anti-endoglin antibody on inflammatory processes in NASH-affected livers and may contribute to the identification of new therapeutic targets. Our results show that the high-fat diet caused steatosis in hepatocytes and inflammation in liver tissue. Staining confirmed the presence of the expected markers ICAM-1 and galectin-3, but we did not observe significant changes in the extent and intensity of the staining reaction when comparing the IgG and M1043 groups. These results suggest that M1043 is unlikely to affect inflammation in NASH.

Keywords: liver, NASH, Kupffer cells, hepatic stellate cells, inflammatory markers, immunohistochemistry

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle bakalářské práce .....	2
3. Teoretická část.....	3
3.1 Játra .....	3
3.1.1 Histologie jater.....	3
3.1.2 Jaterní buňky .....	5
3.1.2.1 Hepatocyty .....	5
3.1.2.2 Kupfferovy buňky .....	6
3.1.2.3 Jaterní hvězdčité buňky .....	8
3.1.2.4 Cholangiocyty.....	10
3.1.2.5 PIT buňky .....	10
3.1.3 Funkce jater.....	10
3.1.3.1 Produkce žluči.....	10
3.1.3.2 Skladování a metabolismus vitaminů rozpustných v tucích.....	11
3.1.3.3 Metabolismus léčiv .....	11
3.1.3.4 Metabolismus bilirubinu .....	12
3.1.3.5 Další funkce.....	13
3.2 Nealkoholické ztukovatění jater (NAFLD) a nealkoholická steatohepatitida (NASH) .....	13
3.2.1 Etiologie.....	13
3.2.2 Patofyziologie .....	14
3.2.3 Zánět u jaterních onemocnění .....	17
3.2.4 Markery zánětu.....	19
3.2.4.1 Intercelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1) .....	19
3.2.4.2 Galektin-3 .....	20
3.3 Zvířecí modely jaterního poškození typu NAFLD/NASH .....	21
3.3.1 Genetické modely.....	21
3.3.2 Dietní modely .....	22
3.3.3 CDAA model .....	22
3.4 Endoglin jako potenciální terapeutický cíl .....	23
3.5 Imunohistochemie .....	24
3.5.1 Princip metody.....	25
3.5.1.1 Příprava tkání.....	25

3.5.1.2 Odhalování antigenních epitopů (antigen retrieval) .....	25
3.5.1.3 Blokování nespecifických vazeb.....	25
3.5.1.4 Primární protilátka .....	25
3.5.1.5 Detekce .....	26
3.5.1.6 Kontrastní barvení .....	27
3.5.1.7 Analýza obrazu .....	27
4. Experimentální část.....	28
4.1 Experimentální zvířata.....	28
4.2 Metodika .....	28
4.2.1 Příprava parafínových řezů.....	28
4.2.2 Barvení preparátů.....	29
4.2.2.1 Postup práce .....	29
5. Výsledky .....	32
6. Diskuse.....	37
7. Závěr .....	39
8. Seznam použitých zkratk .....	40
9. Seznam použitých obrázků.....	42
10. Použitá literatura .....	43

## 1. Úvod

Játra jsou orgánem s mnoha důležitými funkcemi, mezi které patří metabolismus živin, detoxikace, syntéza žluči a regulace metabolismu lipidů. [1] Poruchy v metabolických procesech jater mohou vést k různým onemocněním, včetně NASH (nealkoholická steatohepatitida), což je závažné onemocnění spojené především s obezitou a metabolickým syndromem. NASH se vyznačuje zánětem, nahromaděním tukových kapének v jaterních buňkách a následnou fibrotizací, což může postupovat až k cirhóze a následnému jaternímu selhání. [2]

Studie zaměřené na NASH jsou důležité pro pochopení patofyziologie tohoto onemocnění a hledání nových terapeutických přístupů. Využití myších modelů NASH umožňuje studovat mechanismy patogeneze a testovat potenciální léčebné strategie. V rámci těchto studií je důležité zkoumat expresi markerů zánětu v játrech a jejich regulaci různými látkami. [3]



## 2. Cíle bakalářské práce

Cílem bakalářské práce je prozkoumat vliv anti-endoglinové protilátky M1043 na expresi zánětlivých markerů (zejména ICAM-1 a galektin-3) u myšího modelu NASH prostřednictvím imunohistochemické analýzy. Cílem tohoto výzkumu je pochopit, zda M1043 ovlivňuje zánětlivé procesy v játrech myší s NASH a jaké změny může tato látka způsobit v imunitní odpovědi a patologii jater v tomto modelu onemocnění.

## 3. Teoretická část

### 3.1 Játra

Játra jsou důležitým centrem pro řadu fyziologických procesů. Mezi ně patří metabolismus živin, regulace objemu krve, podpora imunitního systému, homeostáza lipidů a cholesterolu a odbourávání různých sloučenin, včetně mnoha současných léků. Zpracováním živin poskytují energii potřebnou pro funkci výše uvedených procesů, a proto patří metabolismus k nejvýznamnějším činnostem jater. Kromě toho mají játra schopnost ukládat glukózu do zásoby ve formě glykogenu a utvářet glukózu de novo prostřednictvím glukoneogeneze. Dochází zde také k oxidaci lipidů, tvorbě žluči, která lipidy emulguje a usnadňuje jejich rozklad ve střevě, zároveň i k vylučování přebytečných lipidů do ostatních tkání, především do tkáně tukové. V neposlední řadě jsou játra hlavním zpracovatelem bílkovin a aminokyselin, zároveň jsou zodpovědná za tvorbu bílkovin vylučovaných do krve, zpracování aminokyselin pro energii a likvidaci dusíkatých odpadů z rozkladu bílkovin ve formě metabolismu močoviny. Všechny tyto procesy jsou pro život nezbytné. [1]

#### 3.1.1 Histologie jater

Játra se histologicky skládají z následujících složek, které následně utváří základní morfologické a funkční jednotky orgánu:

- Parenchym: Je tvořen hepatocyty.
- Stroma: Skládá se z pojivové tkáně a obsahuje cévy. Pojivovou tkáň stromatu tvoří kolagen typu III (retikulin), který tvoří síť, jež zajišťuje integritu hepatocytů a sinusoid.
- Sinusoidy: Jedná se o fenestrované kapiláry procházející mezi hepatocyty. Stěna kapilár je tvořena endotelovými buňkami, na které naléhají Kupfferovy buňky (viz dále). Právě takové uspořádání stěny umožňuje vstup i velkých molekul do jaterní tkáně, a tudíž jednoduchou látkovou výměnu.
- Disseho prostory (perisinusoidální prostory): Nacházejí se mezi hepatocyty a sinusoidami, jsou významné pro výměnu látek mezi hepatocyty a sinusoidami, v těchto prostorech se nacházejí také Itovy buňky. [4]

Základní morfologickou jednotkou jater je jaterní lalůček, jinak také lalůček centrální žíly. Má podobu šestibokého hranolu (hexagonu) a je tvořen hepatocyty, které jsou uspořádány hvězdicovitě do trámců. Středem lalůčku prochází centrální žíla. V prostorech mezi hepatocyty (Disseho prostorech) se nachází jaterní sinusoidy. Mezi trámci se nachází též žlučové kapiláry, kudy odchází žluč, produkovaná právě hepatocyty. [4]

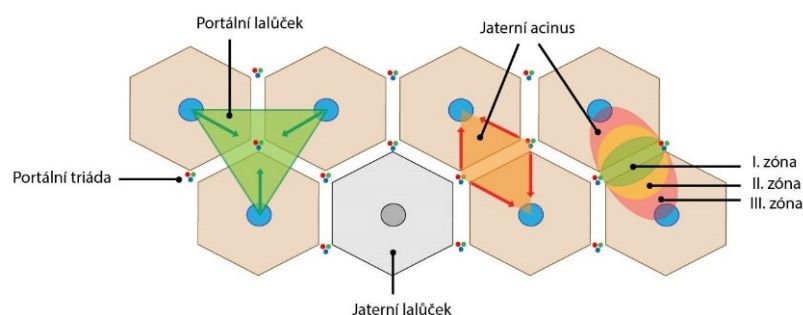
V každém rohu lalůčku se nachází portobiliární prostor, jinak také portální triáda, kterým probíhají interlobulární artérie, přivádějící krev bohatou na kyslík, interlobulární véna, kterou do jater přichází živiny, a interlobulární žlučovod, kterým odchází žluč. Zbytek tohoto prostoru vyplňuje řídké kolagenní vazivo. [4]

Základní funkční jednotkou je portální lalůček, který zaujímá tvar trojúhelníku, v jehož středu se nachází portobiliární prostor. Vrcholy tohoto trojúhelníku jsou tvořeny centrálními žilami sousedních lalůčků. [4]

Nejmenší funkční jednotkou je jaterní acinus tvaru kosočtverce, který se dvěma protilehlými vrcholy dotýká centrálních vén, a zbývajícími dvěma vrcholy zasahuje do portobiliárních prostorů. Histologicky se jaterní acinus dělí ještě na 3 zóny (Obrázek 1), podle toho, jak je která vzdálená od centrální vény:

- Zóna 1: nejbliže přívodným cévám, proto je nejlépe zásobená kyslíkem a živinami, tvoří střed jaterního acinu
- Zóna 2: dále od středu acinu, méně prokrvená
- Zóna 3: nejbliže k centrální véně, sem se dostávají živiny a kyslík jako poslední

Toto dělení do zón má význam především při sledování patologických stavů. [5]

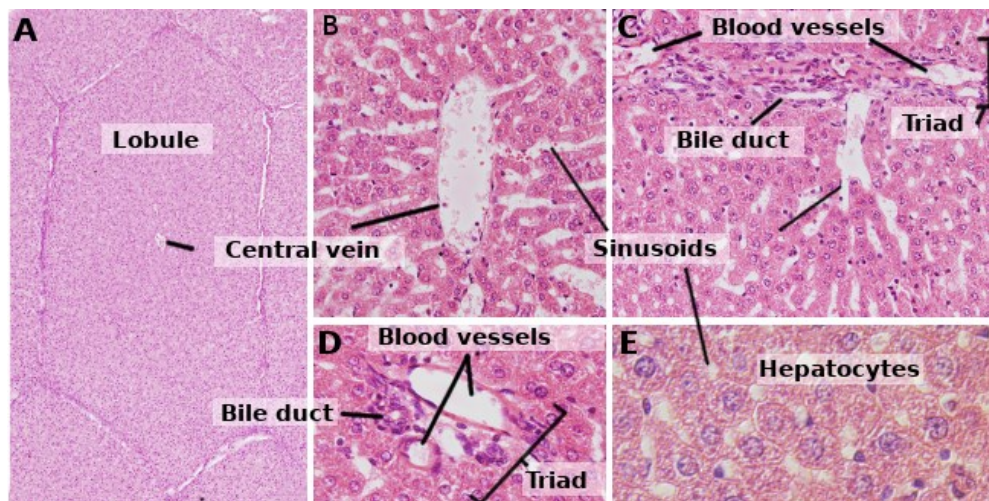


Obrázek 1 Uspořádání jaterní tkáně. Převzato z [6]

### 3.1.2 Jaterní buňky

#### 3.1.2.1 Hepatocyty

Hepatocyty tvoří hlavní část populace jaterních buněk. Mají kubický tvar s kulatými centrálně uloženými jádry a eozinofilní cytoplazmu, která je bohatá na mitochondrie. Tyto buňky jsou uspořádány do trámců kolem centrální vény a jsou navzájem spojeny mezibuněčnými adhezními komplexy a těsnými spoji (Obrázek 2). Jejich jedna strana směřuje do Disseho prostoru (krevní pól), zatímco druhá strana směřuje do žlučových kanálků (žlučový pól) a je pokryta mikroklyky. Hepatocyty jsou zodpovědné za většinu jaterních funkcí, jako je metabolismus, detoxikace, syntéza a skladování živin, sacharidů, tuků a vitaminů. Podílejí se také na sekreční a vylučovací funkci spolu s dalšími jaterními buňkami. Tyto funkce vykonávají různé hepatocyty sídlící v různých zónách jaterních lalůček. [4]

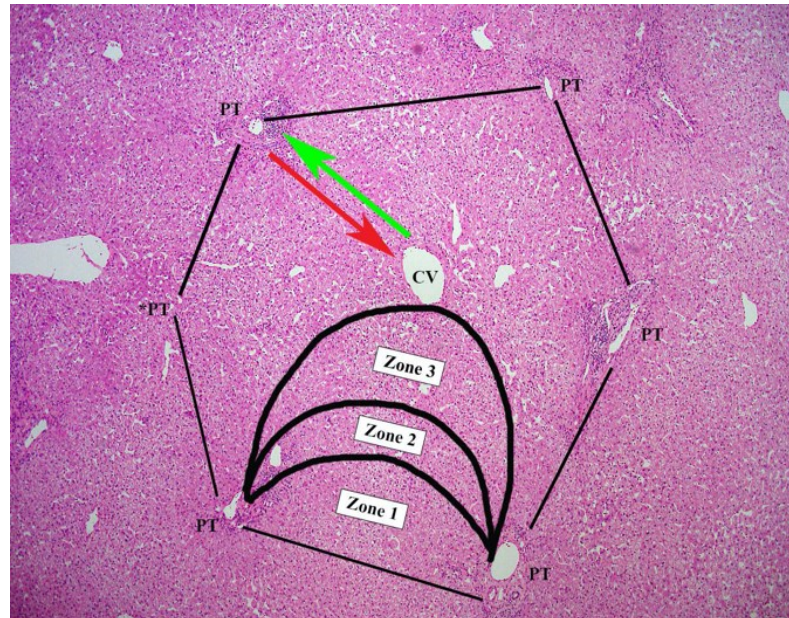


Obrázek 2 Uspořádání hepatocytů. Převzato z [7]

Protože ne všechny buňky jsou stejně vzdálené od přírodních cév, jsou nerovnoměrně zásobovány kyslíkem a živinami. Hepatocyty se také morfologicky liší podle svého umístění vzhledem k nestejnému přívodu krve a liší se i jejich enzymatické složení a hlavní funkce. To se odráží ve výše zmíněném popisu jaterního acinu, který je rozdělen do třech zón. [8]

Zóna 1 je nejlépe zásobena kyslíkem a živinami. Je tvořena hepatocyty, které se nacházejí nejbližší k vyživovací jaterní arteriole. Probíhá zde glukoneogeneze, syntéza glutathionu a energeticky náročné procesy, jako je například syntéza močoviny. Produkce žluči periportálními buňkami závisí na žlučových kyselinách. Zóna 2 je přechodnou zónou a třetí zóna je nejméně zásobena živinami a kyslíkem.

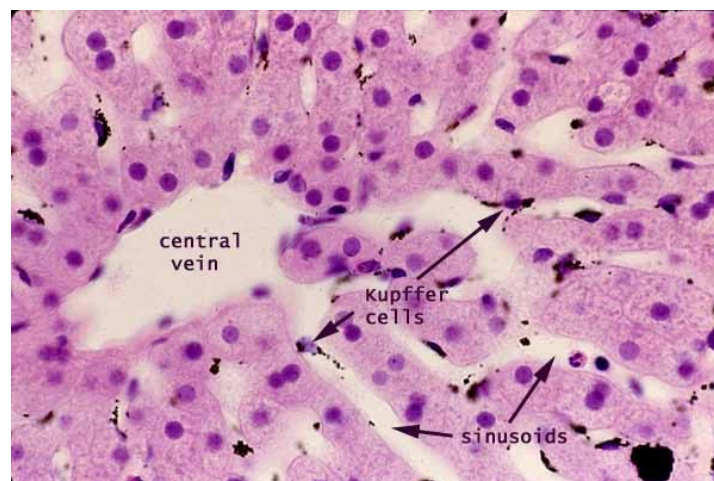
Zde převažuje aktivita cytochromu P450, detoxikace látek a glykolýza, tvoří se glutaminyntetáza a sekrece žluči je nezávislá na žlučových kyselinách (Obrázek 3). [8]



Obrázek 3 Zóny jaterního acinu. Převzato z [9]

### 3.1.2.2 Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky (též Browicz-Kupfferovy buňky) jsou rezidentní jaterní makrofágy lokalizované v lumen jaterních sinusoid, přiléhají k endotelovým buňkám tvořícím stěny těchto cév a hrají klíčovou roli při udržování důležitých jaterních funkcí. Mají nepravidelný tvar a jejich cytoplazmatické výběžky směřují do lumen jaterních sinusoid, mohou ale pronikat také skrze fenestrovanou stěnu do Disseho prostoru (Obrázek 4). [10]



Obrázek 4 Kupfferovy buňky. Převzato z [11]

Kupfferovy buňky, největší populace makrofágů sídlících ve tkáních, vykazují důležitou tolerogenní funkci, která zabraňuje vyvolání imunity proti neškodným antigenům, jako jsou živiny pocházející ze střeva a antigeny ze starých nebo mrtvých buněk, které byly odstraněny z krevního oběhu. Spolu s dendritickými buňkami a jaterními sinusoidálními endotelovými buňkami tvoří Kupfferovy buňky retikulo-endoteliální systém (jinak také monocyto-makrofágový systém), jehož funkcí je odstraňovat antigeny a molekulární struktury spojené s patogeny a odbourávat nežádoucí produkty a toxiny ze sinusoidální krve. [10]

Vzhledem k tomu, že Kupfferovy buňky jsou umístěny v játrech, jsou ve styku s T-lymfocyty, NK (natural killer) buňkami a NKT (natural killer T) buňkami. Za normálních podmínek na svém povrchu exprimují nízké hladiny MHC (major histocompatibility complex) II. třídy a ko-stimulačních molekul, a prostřednictvím produkce prostaglandinu E mohou inhibovat aktivaci antigenně specifických T-lymfocytů, vyvolanou dendritickými buňkami. Kromě toho mohou vyvolat supresivní aktivitu regulačních T-lymfocytů tím, že s nimi interagují a stimulují produkci IL-10 (interleukin 10), který je klíčový pro vznik tolerance vůči antigenům exprimovaným hepatocyty. Aby mohly Kupfferovy buňky plnit svou tolerogenní funkci, mají schopnost exprimovat a vylučovat IL-10 a TGF- $\beta$  (transformující růstový faktor beta) a následně tlumit T-lymfocyty. Tato tolerogenní vlastnost je za fyziologických podmínek nezbytná k prevenci nežádoucích imunitních reakcí. [10]

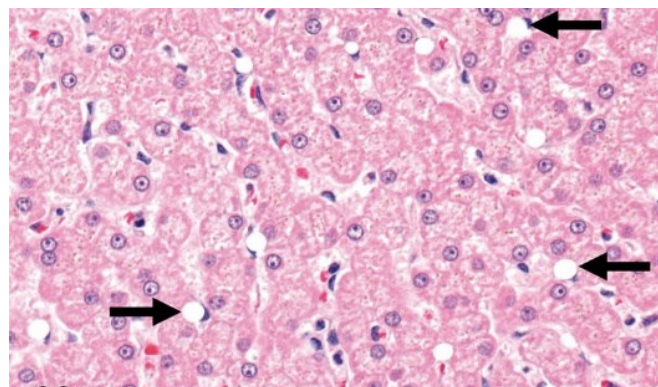
Kupfferovy buňky mají jako makrofágy důležitou funkci ve vrozené imunitní odpovědi v játrech. Játra za normálních podmínek exprimují nízké hladiny mRNA kódující TLR (toll-like receptory) a jejich navazující signální dráhy. Rozpoznávání lipopolysacharidů ze střevní mikroflóry pomocí TLR přítomných na povrchu Kupfferových buněk vyvolává za specifických podmínek jak imunitní aktivaci, tak i toleranci. Absence těchto buněk by tedy usnadnila růst bakterií v játrech, zejména v apoptických hepatocytech a ve slezině. Aktivace Kupfferových buněk během bakteriální infekce spočívá v rozpoznávání mezi povrchovými bakteriálními lipopolysacharidy a lektiny a receptory exprimovanými na povrchu Kupfferových buněk. Tyto ligand-receptorové interakce aktivují syntézu zánětlivých mediátorů, jako jsou IL-6 (interleukin 6), IL-12 (interleukin 12), IL-1 $\beta$  (interleukin 1-beta), TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor alfa) a oxid dusnatý, které následně inhibují

množení mikroorganismů. Kromě toho Kupfferovy buňky produkují i další cytokiny, jako jsou makrofágové zánětlivé proteiny MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein - 1 $\alpha$  a 1 $\beta$ ), chemotaktické cytokiny MCP-1 a MCP-2 (monocyte chemoattractant protein - 1 a 2), které mobilizují monocyty a neutrofile do jater, aby kontrolovaly bakteriální infekci. [10]

Jedním z hlavních zdrojů aktivátorů Kupfferových buněk je hepatocelulární nekróza, která je přímým důsledkem poškození jater. Jakmile jsou tyto buňky aktivovány, vykazují schopnost diferencovat se na makrofágy podobné M1 (klasické) nebo M2 (alternativní) v závislosti na signálech, které dostávají ze svého okolí. Populace makrofágů M1 a M2 se liší svou schopností reagovat na různé podněty a repertoárem chemokinů/cytokinů a receptorů, které exprimují po své aktivaci. Obě populace se však stávají aktivními makrofágy s vysokou syntézou a sekrecí zánětlivých mediátorů včetně cytokinů, superoxidu, oxidu dusnatého, eikosanoidů, chemokinů a lysozomálních a proteolytických enzymů. Kromě toho vykazují vysokou fagocytární a sekreční aktivitu. [10]

### *3.1.2.3 Jaterní hvězdčité buňky*

Jaterní hvězdčité buňky (hepatic stellate cells, HSC), zvané též Itovy buňky, se nacházejí v Disseho prostoru a tvoří v játrech minoritní buněčnou populaci (5-10 %), ale mají několik zásadních funkcí v normálních játrech i při reakci na poškození. Itovy buňky jsou známé především pro svoji schopnost aktivace při poškození jater a pro produkci kolagenní extracelulární matrix při fibróze jater. V případě, že nedojde k poškození jater, jsou Itovy buňky v klidovém stavu, kdy je jejich hlavní funkcí ukládání retinoidů nebo metabolitů obsahujících vitamin A v charakteristických lipidových kapénkách (Obrázek 5). [12]

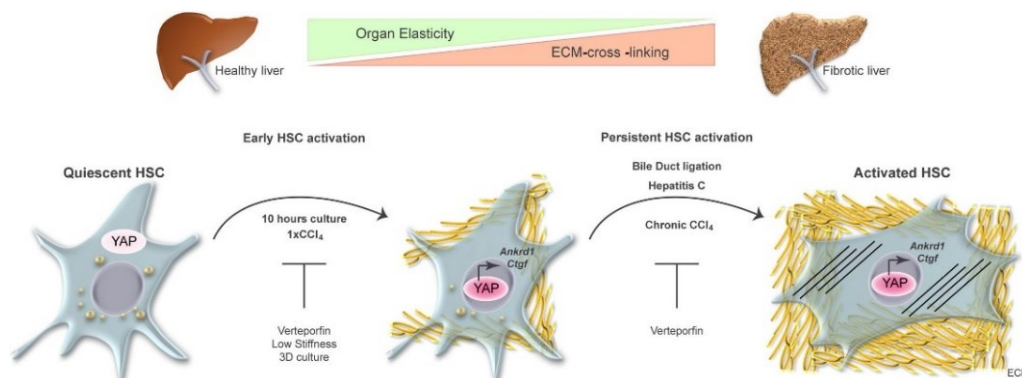


Obrázek 5 Itovy buňky. Převzato z [13]

V normálních lidských játrech lze tyto buňky identifikovat právě podle přítomnosti těchto lipidových kapének. Kromě toho řada hvězdicovitých buněk v normálních játrech exprimuje alfa-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (alfa hladkosvalový aktin). Při akutním poškození jater dochází k rozšíření populace hvězdicovitých buněk se zvýšenou expresí  $\alpha$ -SMA, a právě díky tomu hrají hvězdicovité buňky důležitou roli v přestavbě extracelulární matrix při regeneraci po poškození. [12]

Během jaterního zánětu se  $\alpha$ -SMA podílí na reakci tkáně při poškození. Přesná role  $\alpha$ -SMA v tomto procesu závisí na konkrétním typu zánětu a jeho etiologii. Nicméně, obecně lze říci, že během jaterního zánětu může  $\alpha$ -SMA hrát několik rolí. Při chronickém zánětu může přispívat k fibrogenézi v játrech. To může vést k fibróze, tj. nahrazení normální tkáně jaterního parenchymu pojivovou tkání, což může ovlivnit funkci jater. Hladké svalové buňky, nacházející se v cévách a kanálcích jater, které obsahují  $\alpha$ -SMA, jsou důležité pro regulaci průtoku krve v játrech. Během zánětu může docházet k dysregulaci těchto buněk a tím pádem ke změnám v průtoku krve. Zároveň může hrát roli v imunitní odpovědi během zánětu. Například může být zapojen do interakcí mezi imunitními buňkami a buňkami jaterního parenchymu. Jaterní zánět může stimulovat expresi  $\alpha$ -SMA jako odpověď na poškození tkáně. Tato změna v expresi může ovlivnit mechanické vlastnosti jaterní tkáně a její schopnost reagovat na zánětlivé podněty. [12]

Při chronickém poškození jater se hvězdicovité buňky diferencují na buňky podobné myofibroblastům s výraznou expresí  $\alpha$ -SMA a příležitostnou expresí desminu. Myofibroblastům podobné buňky mají v chronicky postižených játrech vysokou fibrogenní aktivitu a podílejí se také na degradaci matrix (obrázek 6). [12]



Obrázek 6 Aktivované HSC. Převzato z [14]



Přeměna hvězdicovitých buněk v buňky podobné myofibroblastům je regulována složitou sítí mezibuněčné komunikace mezi hvězdicovitými buňkami a aktivovanými Kupfferovými buňkami, poškozenými hepatocyty, krevními destičkami, endotelovými a zánětlivými buňkami, do níž jsou zapojeny cytokiny a nepeptidové mediátory, jako jsou reaktivní formy kyslíku, eikosanoidy a acetaldehyd. Tato zjištění naznačují, že hvězdicovité buňky hrají aktivní roli v řadě lidských jaterních onemocnění, přičemž zvláštní vzorec reaktivity se projevuje u fibrotických jaterních poruch. [12]

#### *3.1.2.4 Cholangiocyty*

Cholangiocyty jsou epitelové buňky, které tvoří výstelku žlučových cest. Slouží převážně k úpravě vzniklé žluči, a to reabsorpcí anebo sekrecí různých látek. [4]

#### *3.1.2.5 PIT buňky*

PIT buňky jsou jaterní specifické NK buňky, patří do skupiny sinusoidálních buněk spolu s Kupfferovými buňkami, endotelovými buňkami a buňkami ukládajícími tuk. PIT buňky jsou lymfoidní buňky obsahující specifická granula, což je řadí také mezi velké granulární lymfocyty. Pravděpodobně pocházejí z kostní dřene, cirkulují v krvi a osidlují játra. PIT buňky zůstávají v játrech asi 2 týdny a jsou závislé na Kupfferových buňkách. PIT buňky se také lokálně množí, pokud jsou stimulovány interleukinem-2 (IL-2), to je cytokin zodpovědný za proliferaci T lymfocytů, modifikátory biologické odpovědi nebo jinými látkami. PIT buňky během usmrcování ulpívají na cílových nádorových buňkách. Mají vysokou úroveň přirozené cytotoxicity vůči různým liniím nádorových buněk, která se zesiluje při současném působení s Kupfferovými buňkami. [15]

### *3.1.3 Funkce jater*

#### *3.1.3.1 Produkce žluči*

Žluč je velice důležitá tělní tekutina, jelikož pomáhá vylučovat látky, které se nevylučují ledvinami, a napomáhá vstřebávání a trávení lipidů pomocí žlučových solí a kyselin. Žluč je produkována hepatocyty, a kromě dalších látek se skládá především z vody, elektrolytů, žlučových solí, žlučových kyselin, cholesterolu, žlučového barviva, bilirubinu a fosfolipidů. Je vylučována z hepatocytů do žlučových kanálků, odkud putuje z menších kanálků do větších, a nakonec končí ve dvanáctníku tenkého střeva nebo je uložena ve žlučníku, kde se skladuje a koncentruje. Po její sekreci do

dvanáctníku prochází enterohepatálním oběhem, kde plní svou úlohu ve střevě – emulguje tuk z potravy, a složky žluči, které se nevyloučí, jsou recyklovány přeměnou na žlučové kyseliny střevními bakteriemi pro opětovné využití vstřebáním v ileu a transportem zpět do jater. [16]

### *3.1.3.2 Skladování a metabolismus vitaminů rozpustných v tucích*

Většina vitaminů rozpustných v tucích se dostává do jater absorpcí střevní stěnou ve formě lipoproteinů – chylomikronů nebo lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL). Játra ukládají a/nebo metabolizují vitaminy rozpustné v tucích. Jak již bylo zmíněno dříve, vitamin A je uložen v Itoových buňkách. Může zde podléhat oxidaci na retinal a následně kyselinu retinovou, ta může být konjugována na glukuronid a vyloučena do žluči. Vitamin D<sub>3</sub>, ať pochází z kůže, živočišných nebo rostlinných produktů, musí projít 25-hydroxylací jaterním systémem enzymů rodiny cytochromu P450 (CYP450), který ho dále hydroxyluje v ledvinách, aby došlo ke vzniku jeho funkční formy. Jaterní systém CYP450 pak hydroxyluje uhlík 24, čímž se vitamin D stane neaktivním. Vitamin E játra přijímají v jeho alfa a gama-tokoferolové formě. Alfa-tokoferol je v játrech zabudován do VLDL nebo lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) a poté je vylučován zpět do oběhu, zatímco gama-tokoferolovou formu játra metabolizují pro vylučování. Vitamin K se v játrech neukládá ani nemetabolizuje, jeho přítomnost je ale nezbytná, jelikož jaterní enzym gama-glutamylkarboxyláza jej vyžaduje pro gama-karboxylaci koagulačních faktorů II, VII, IX, X a proteinů C a S. [16]

### *3.1.3.3 Metabolismus léčiv*

Další nezanedbatelnou funkcí jater je metabolismus a detoxikace xenobiotik. Pro některé z těchto látek játra využívají lysozomy, ale hlavní cestou metabolismu a detoxikace je biotransformace. Funkce jater spočívá v transformaci xenobiotik, především v jejich přeměně z lipofilní formy na hydrofilní formu prostřednictvím dvou reakcí: fáze I a fáze II. Tyto reakce probíhají především v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů. [16]

Při reakci fáze I se vytvářejí hydrofilnější rozpuštěné látky prostřednictvím oxidace, redukce a hydrolýzy za použití CYP450. Produkt fáze I obsahuje druh kyslíku, který lépe reaguje s enzymy zapojenými do reakcí fáze II. Reakce fáze II

konjugují metabolity vytvořené ve fázi I, aby byly hydrofilnější pro vylučování do krve nebo žluči. [16]

Existují tři hlavní způsoby konjugace prováděné v reakcích fáze II: konjugace na glukuronát, glutathion nebo sulfát. Konjugace na glukuronát, jako například u bilirubinu, probíhá v hladkém endoplazmatickém retikulu. Látky podléhající sulfátové konjugaci, jako jsou alkoholy, se obvykle konjugují v cytosolu vzhledem k umístění potřebných enzymů. Většina konjugace glutathionu probíhá v cytosolu, menšina v mitochondriích. U reakcí, při nichž se produkt konjuguje za vzniku glutathionu, je nezbytné, aby byl glutathion redukován, nedostatek redukovaného glutathionu pro konjugaci může totiž způsobit nahromadění toxických metabolitů, k čemuž dochází například při předávkování paracetamolem. [16]

Transport metabolitů, vzniklých z výše zmíněných reakcí, označují některé zdroje jako fázi III. Další orgány, jako jsou ledviny a střeva, mohou také napomáhat při metabolismu léků, avšak nejzásadnější roli zde zaujímají právě játra. Metabolismus léků také ovlivňují i jiné faktory, některými z nich jsou věk, pohlaví, interakce mezi léky, diabetes, těhotenství, onemocnění jater nebo ledvin, zánět či genetika. [16]

#### *3.1.3.4 Metabolismus bilirubinu*

Játra hrají významnou roli při odbourávání hemu. Hemolýza probíhá na více místech v těle, včetně jater, sleziny a kostní dřeně. Hem se rozkládá na biliverdin, který se následně redukuje na nekonjugovaný bilirubin. Do jater se z oběhu dostává nekonjugovaný bilirubin vázaný na albumin a následně podléhá konjugaci prostřednictvím systému uridindifosfát-glukuronyltransferázy, což je proces již dříve zmíněné fáze II, a stává se hydrofilním. Nově konjugovaný bilirubin se pak vylučuje žlučovými kanálky do žluči nebo se v malém množství rozpouští v krvi, kterou se poté dostává do ledvin, kde se filtruje a vylučuje. Většina konjugovaného bilirubinu se dostává do žluči a vylučuje se spolu s ní ve stolici, jelikož není vstřebatelný střešní stěnou. Část bilirubinu je střevními bakteriemi přeměněna na urobilinogen nebo nekonjugovaný bilirubin, který se zpětně vstřebává a prochází enterohepatálním oběhem. [16]

### 3.1.3.5 Další funkce

Játra se podílejí také na funkci hormonů štítné žlázy, a to jako místo, kde dochází k dejodaci hormonu T4 (tyroxin) na T3 (trijodtyronin). Zároveň řídí syntézu téměř všech plazmatických bílkovin v těle, jako příklad lze uvést albumin, vazebné globuliny, protein C, protein S a všechny srážecí faktory vnitřní a vnější cesty srážení krve, kromě faktoru VIII. [16]

## 3.2 Nealkoholické ztukovatění jater (NAFLD) a nealkoholická steatohepatitida (NASH)

Nealkoholické ztukovatění jater (non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD) je onemocněním definované jako ektopické hromadění tuku v játrech (jaterní steatóza), pokud nejsou přítomny žádné jiné příčiny sekundárního hromadění tuku v játrech. Ačkoli se v játrech zdravých dospělých osob může vyskytovat drobné ukládání tuku, ukládání tuku ve více než 5 % hepatocytů se považuje za patologické. NAFLD zahrnuje jak nealkoholické ztukovatění jater, tak nealkoholickou steatohepatitidu (NASH), která je diagnostikována při průkazu zánětlivé aktivity a poškození hepatocytů ve steatotické jaterní tkáni. [2]

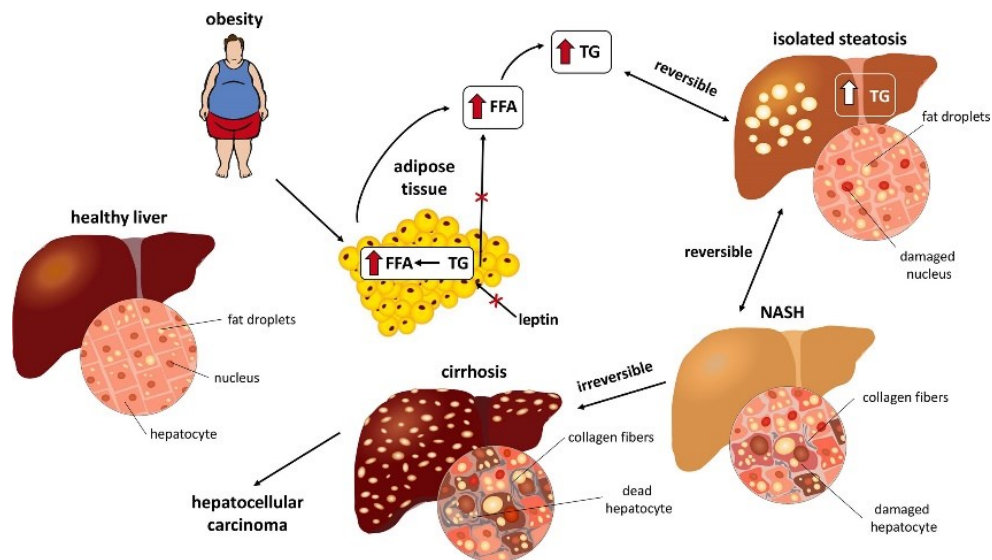
Diagnóza NAFLD by neměla být stanovena u pacienta, který má v anamnéze významnou konzumaci alkoholu. Za přijatelnou úroveň denní konzumace alkoholu se považuje méně než 20 g/den u mužů a 10 g/den u žen. Tyto hraniční hodnoty však nejsou přesně definovány, zejména u pacientů s předchozí anamnézou intenzivního užívání alkoholu a u pacientů se sklonem k NASH. [2]

NASH může progredovat do jaterní fibrózy, cirhózy a hepatocelulárního karcinomu, přičemž přibližně u 30 až 40 % pacientů dochází právě k rozvoji fibrózy. NASH není jednoznačnou diagnózou a může být spojena s jinými jaterními onemocněními, jako je například chronická hepatitida C. NASH se dělí na dva typy, primární; který souvisí s obezitou a diabetem v nepřítomnosti nadměrného příjmu alkoholu, a sekundární; který je vyvolán toxiny nebo léky. [2]

### 3.2.1 Etiologie

S NAFLD a NASH jsou spojeny určité stavy, v první řadě je s tímto onemocněním silně spojen metabolický syndrom, který zahrnuje obezitu, diabetes mellitus 2. typu nebo hyperinzulinemii, hypertenzi a dyslipidemii. Přibližně tři

čtvrtiny pacientů s inzulinovou rezistencí a diabetes mellitus 2. typu mají ztukovatělá játra s vyšší prevalencí cirhózy (Obrázek 7). Další metabolické a genetické stavy, které jsou spojeny s NAFLD, jsou například polycystické vaječníky, lipodystrofie, mitochondriální onemocnění a Wilsonova choroba. S NAFLD jsou též spojeny jak stavy nutričního přetížení, jako je celková parenterální výživa, tak i malnutrice, jako je Kwashiorkor a celiakie. [2]



Obrázek 7 Spojení NASH a obezity. Převzato z [17]

### 3.2.2 Patofyziologie

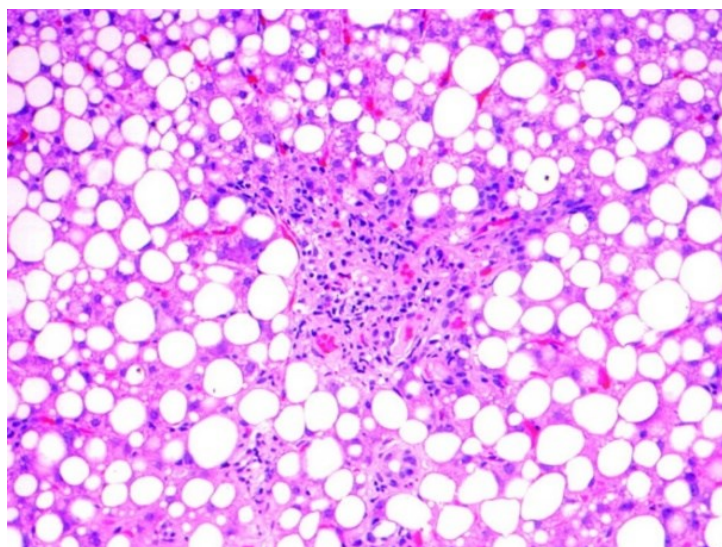
Mechanismus NAFLD lze vysvětlit hypotézou "dvou zásahů", která zahrnuje steatózu (první zásah), po níž následuje oxidační stres a poškození (druhý zásah). Zvýšené ukládání jaterního tuku je především důsledkem nerovnováhy mezi přívodem a spotřebou energie. NAFLD je tedy jaterním projevem dysfunkce tukové tkáně sekundárně způsobené nadbytkem energie. [2]

Tři hlavní zdroje volných mastných kyselin, ze kterých tuk vzniká, jsou v játrech plazmatické neesterifikované mastné kyseliny z tukové tkáně (60 %), de novo lipogeneze v játrech (25 %) a volné mastné kyseliny z chylomikronů v potravě (15 %). Játra se tuku zbavují buď prostřednictvím beta-oxidace mastných kyselin, která probíhá převážně v mitochondriích a v případě přebytku energie v peroxizomech a cytochromu P450, nebo jejich exportem ve formě VLDL. [2]

Neesterifikované mastné kyseliny v plazmě se zvyšují, když je adipocyt (buňka tukové tkáně) přetížen, což vede ke zvýšené lipolýze. Tuková tkáň uvolňuje volné

mastné kyseliny také v reakci na hormony, jako je glukagon, adrenalin a adrenokortikotropní hormon. Inzulin inhibuje lipolýzu tukové tkáně po jídle, při inzulinové rezistenci adipocytů tak dochází k nesprávné postprandiální lipolýze v tukové tkáni. Dlouhodobé hladovění též způsobuje uvolňování tuku z adipocytů, které může být také příčinou NASH, pokud je přetížena schopnost hepatocytů tuk zpracovávat. Nadměrný příjem kalorií a parenterální výživa způsobují jaterní lipotoxicitu v důsledku zvýšené de novo lipogeneze v játrech, ve snaze zbavit se nadbytečných sacharidů. Mononenasyčené mastné kyseliny jsou potřebné k syntéze triglyceridů, což zabraňuje buněčnému poškození tím, že přebytečné mastné kyseliny zůstávají v játrech v esterifikované, inertní formě. Nedostatečná syntéza mononenasyčených mastných kyselin v játrech nebo jakákoli porucha sekrece VLDL může způsobit toxické hromadění tuku v hepatocytu. Steatóza také může být následkem mitochondriální dysfunkce v důsledku poruchy beta-oxidace mastných kyselin (jako u alkoholické steatózy, NASH, akutního ztukovatění jater v těhotenství a užívání léků, např. kyseliny valproové). [2]

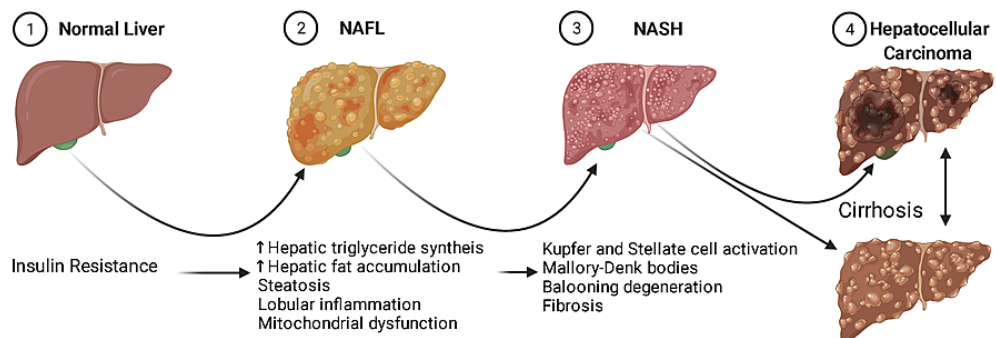
Akumulace jaterních triglyceridů, která se typicky projevuje jako jaterní steatóza, je tedy pravděpodobně obranným mechanismem pro zvládnutí energetického nadbytku v játrech (Obrázek 8). Toxické hromadění tuku v hepatocytech je způsobeno netriglyceridovými metabolity volných mastných kyselin. Triglyceridy ve formě lipidových kapének jsou netoxickým mechanismem k ukládání mastných kyselin v inertní formě. [2]



Obrázek 8 Steatóza. Převzato z [18]

Pravděpodobnost hypotézy dvou zásahů je však sporná, protože nebylo pokaždé prokázáno, že izolovaná steatóza předchází NASH, a že typ tuku, který se obvykle hromadí v játrech při izolované steatóze (neutrální tuk nebo triglyceridy), se liší od toxického tuku (jehož hromadění vede k NASH). Zároveň model dvou zásahů nevysvětluje, proč dochází k prvnímu zásahu (steatóze). Přítomnost steatózy sama o sobě může být markerem hepatotoxického stresu, a je pravděpodobné, že NASH následuje, když adaptační reakce na stres hepatocytů nedokážou udržet jejich životaschopnost. [2]

Výsledkem celé kaskády událostí je mitochondriální dysfunkce, která narušuje oxidační fosforylaci a schopnost buněk syntetizovat adenosintrifosfát (ATP) a poskytovat energii potřebnou k udržení jejich struktury a funkce. To vede k produkci reaktivních forem kyslíku, což vede k poškození endoplazmatického retikula a peroxidaci lipidů. Peroxidace lipidů následně poškozuje DNA, bílkoviny a membrány, kvůli čemu dochází k bobtnání buňky a narušení jejího cytoskeletu, což vede k apoptóze a lokální nekróze. V reakci na poškození buněk a nekrózu se následně uvolňují zánětlivé cytokiny, které způsobují zánět a aktivují hvězdicovité buňky, které ukládají kolagen, což vede k fibróze. Jaterní lipotoxicita sekundárně způsobená nadbytkem energie tak vede k dalším poškozujícím procesům, jako je dysfunkce tukové tkáně, oxidační stres, stres endoplazmatického retikula, neúčinná autofagie a dysbióza střevní flóry, což vše způsobuje sterilní zánět hepatocytů. Apoptóza, nekróza a nekroptóza hepatocytů je konečným výsledkem případné progresy do fibrózy a jaterní cirhózy (Obrázek 9). [2]

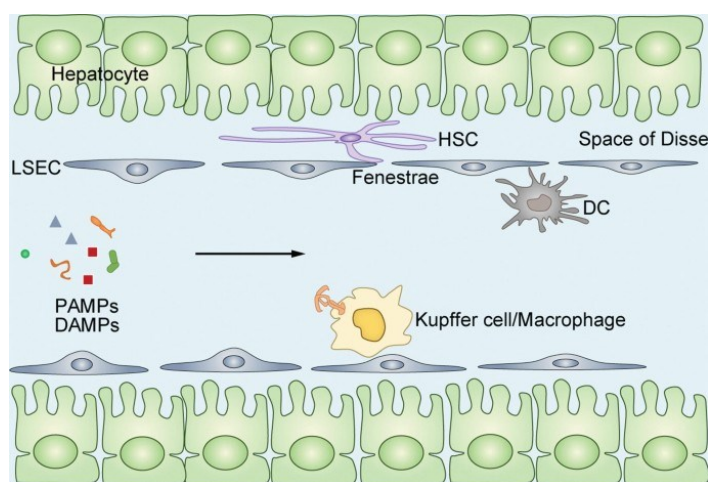


Obrázek 9 Progrese NAFLD. Převzato z [19]

### 3.2.3 Zánět u jaterních onemocnění

Nadměrná akumulace lipidů v buňkách vede k poškození hepatocytů, což aktivuje zánětlivou reakci, která zhoršuje průběh jaterního onemocnění a která naopak zpětně podporuje aktivaci zánětu. [20]

Klíčovou roli v imunitní odpovědi a patogenezi zánětu jater mají makrofágy, a to především Kupfferovy buňky, dále také dendritické buňky, monocyty a neutrofilové. Ty mají schopnost fagocytózy, což znamená, že mohou pohltnout a zničit bakterie, viry, poškozené buňky a další cizorodé látky v játrech. Aktivované makrofágy dále produkují také různé prozánětlivé cytokiny, jako je TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6, které jsou zodpovědné za vyvolání a udržení zánětlivé reakce v játrech, mohou prezentovat antigenní materiál ostatním buňkám imunitního systému, což zvyšuje imunitní odpověď a aktivuje další imunitní buňky, jako jsou T-lymfocyty. Dále exprimují různé pattern recognition receptory (PRR), jako jsou TLR (receptory podobné genu Toll – toll-like receptory) a NLR (receptory podobné NOD), které rozpoznávají molekuly zvané patogen-associated molecular patterns (PAMP) a damage-associated molecular patterns (DAMP). Tím se zapojují do iniciace zánětu v játrech (Obrázek 10). A nakonec mohou být zapojeny do metabolických procesů souvisejících s lipidovou homeostázou v játrech a mohou reagovat na nadměrnou akumulaci lipidů, což může přispívat k rozvoji zánětu a poškození jaterní tkáně. [21]



Obrázek 10 Aktivace Kupfferových buněk PAMP/DAMP. Převzato z [22]

Spuštění jaterního zánětu, jak bylo uvedeno výše, je způsobeno nahromaděním infekčního a neinfekčního materiálu, který se uvolňuje při poškození buněk a je rozpoznáván PRR receptory. Endogenní molekuly, které jsou produkovány v



důsledku buněčného poškození nebo stresu a vedou k zánětlivé reakci, již dříve zmíněné DAMP a PAMP molekuly, nebo také alarminy, jsou velmi rozmanité a nemají mezi sebou společnou strukturu. V patologii jaterních onemocnění a zánětu jater jsou zahrnuty také zánětem indukované částice, jako jsou krystaly cholesterolu. Tyto cholesterolové krystaly způsobují nejen vznik aterosklerotických plátů, ale i zánětu, a jsou přítomny u lidí a myši s NASH. Kandidáty na vznik těchto krystalů jsou volné mastné kyseliny, které se uvolňují při poškození jater. [20]

Další molekulou, která způsobuje zánět jater, je kyselina palmitová, která byla nedávno spojena s receptorem TLR2. Ligand kyseliny palmitové TLR2 indukuje aktivaci kaspázy-1 a uvolňování IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , což má zjevnou roli v zánětlivém procesu jater. [20]

Mnohé z těchto DAMP molekul aktivují PRR receptory přítomné v imunitních buňkách, přičemž TLR receptory jsou popsány ze všech nejlépe. Při onemocnění jater vyvolává přesytení mastnými kyselinami zánět v hepatocytech, který zvyšuje indukci aktivace kaspázy-1 a uvolňování IL-1 $\beta$ . To má za následek uvolňování většího množství DAMP z hepatocytů, čímž vzniká zpětná vazba, která zesiluje zánětlivou reakci. [20]

Mezi různými receptory NLR je nejlépe charakterizován inflamasom NLRP3, který je spojen s širší škálou onemocnění včetně infekcí, autoinflamatorních onemocnění a dalších autoimunitních onemocnění. Inflamasom NLRP3 má charakteristické vlastnosti, jako je např. to, že vytváří komplex s proteinem CARD, který aktivuje kaspázu-1, nebo že indukuje zránění a sekreci důležitých proteinů a prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1 $\beta$  a IL-18 (interleukin 18). [20]

Aktivace inflamasomu NLRP3 hraje klíčovou roli při zánětu jater. Tento proces probíhá ve dvou krocích. Nejprve jsou TLR aktivovány různými DAMP a PAMP molekulami. TLR pomáhají regulovat zánětlivé reakce a jsou exprimovány v různých jaterních buňkách. Tato aktivace vede k uvolňování cytokinů, což přispívá k progresi jaterního onemocnění. Zejména TLR4 hraje důležitou roli v jaterním zánětu a fibrogenezi. Kupfferovy buňky, první obranná linie jater, exprimují TLR4 a jsou stimulovány lipopolysacharidy (například z bakteriální stěny). Tato stimulace spouští produkci prozánětlivých cytokinů a podporuje poškození hepatocytů.

Kromě toho aktivuje hvězdicovité buňky a reguluje složky související se zánětlivým systémem. Druhý krok zahrnuje oligomerizaci NLRP3 a sestavení komplexu, což má za následek přeměnu prokaspázy-1 na kaspázu-1. To vede k produkci a sekreci zralých IL-1 $\beta$  a IL-18. [20]

### 3.2.4 Markery zánětu

Jako zánětlivé markery se popisují různé laboratorní ukazatele zánětlivého procesu. Tyto markery se exprimují na povrchu buněk nebo vyplavují do krve na základě probíhajícího zánětu a mohou být specifické pro dané orgány.

#### 3.2.4.1 Intercelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1)

Skupina proteinů ICAM hraje klíčovou roli při adhezi a migraci buněk, zejména během imunitních reakcí, zánětů a dalších procesů, jako je například přenos signálů mezi buňkami. Jednou z nejdetailněji prozkoumaných adhezních molekul imunoglobulinového typu je intercelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1). Tato molekula je produkována v rámci imunitní odpovědi řadou hematopoetických buněk, jako jsou B buňky, T buňky, dendritické buňky a makrofágy, ale také nehematopoetickými buňkami, včetně endotelových buněk. [23]

ICAM-1 na endotelových buňkách hraje klíčovou roli v migraci aktivovaných leukocytů do místa infekce. Je kostimulační molekulou pro antigen prezentující buňky při interakci s MHC II reagujícími T buňkami a s MHC I při aktivaci cytotoxických T-lymfocytů. Také slouží jako ligand pro hlavní lymfocytární integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). Exprese ICAM-1 je stimulována cytokiny TNF- $\alpha$  a IL-1, které jsou utvářeny makrofágy při zánětu, IFN- $\gamma$  (interferon gama), a bakteriálními lipopolysacharidy, naopak je inhibována glukokortikoidy. [23]

Jako člen imunoglobulinové superrodiny má ICAM-1 doménovou strukturu. Jeho extracelulární část na N-konci se skládá z 5 domén a je spojena krátkou intracelulární částí C-konce transmembránovým segmentem. Kromě membránové formy existují také rozpustné (solubilní) formy ICAM-1, nazývané sICAM-1, které mají podobnou extracelulární část. Tyto formy se mohou v tělních tekutinách agregovat do multimerních komplexů, především dimerních. Vznik rozpustných molekul je vysvětlován buď uvolňováním extracelulárního segmentu membránové

molekuly prostřednictvím proteolytických enzymů, nebo alternativním sestřihem mRNA. [23]

Na rozdíl od membránové formy, která podporuje imunitní procesy účastněním se mezibuněčných interakcí, dimerická rozpustná forma sICAM-1 může tyto procesy inhibovat tím, že soutěží o vazebná místa, a má tak imunosupresivní účinky. Studie ukázaly, že sICAM-1 výrazně inhibuje interakce kultivovaných nádorových buněk s NK buňkami a ovlivňuje i T buňky. Rhinoviry, lidské viry způsobující nachlazení, využívají membránový ICAM-1 jako svůj buněčný receptor a jsou schopny regulovat expresi této adhezní molekuly, což může zvyšovat jejich infektivitu. Tento efekt potvrzují *in vitro* inhibiční účinky rekombinantního sICAM-1 a jeho profylaktické působení *in vivo*. Studie naznačují, že kromě účinků na imunitní reakce může mít sICAM-1 i přímý vliv na novotvorbu cév a růst nádorů, jak naznačují experimenty na zvířecím modelu. [23]

#### 3.2.4.2 Galektin-3

Galektiny jsou důležitými regulátory homeostázy imunitních buněk i imunitních reakcí. Některé galektiny, např. galektin-3, působí na zvýšení imunitní reaktivity a zánětlivé kaskády. Jiné, jako např. galektin-1, hrají klíčovou roli při vypínání funkcí imunitních buněk, např. spouštěním jejich apoptózy. Tyto různé účinky se šíří interakcí konkrétních galektinů se specifickými receptorovými glykoproteiny. Specifické interakce mohou vést k regulaci přežívání a signalizace imunitních buněk, jejich růstu a chemotaxe a sekrece různých cytokinů ovlivňujících diferenciaci určitých typů imunitních buněk. Nejnovější studie také ukazují na roli galektinů při infekci některými lidskými patogeny. V důsledku toho jsou galektiny atraktivním terapeutickým cílem u autoimunitních, zánětlivých, alergických i nádorových a infekčních onemocnění. [24]

Galektin-3 se účastní různých patofyziologických procesů, včetně apoptózy, adheze, angiogeneze, buněčné migrace, proliferace a diferenciaci, ale jeho hlavní funkcí je indukce fibrotického procesu a zánětlivého stavu, kde slouží jako ligand pro TLR receptory. Galektin-3 je nejvíce exprimován v tkáňových makrofázích, původně byl objeven v peritoneálních makrofázích myši a označen jako Mac-2 antigen, nachází se ale i v jiných buňkách, jako jsou dendritické buňky, endotelové a nebo epitelové buňky. Jeho funkce ovlivňuje chování makrofágů a podílí se na vytváření

profibrotického charakteru makrofágů prostřednictvím interakce s transmembránovým receptorem CD98. Zvýšená přítomnost galektinu-3 v tkáních trvale zanícených aktivuje Itovy buňky, které se tak transformují v myofibroblasty, což má za následek produkci extracelulární matrix a následné zjizvení tkáně. Jeho účinky v kontextu profibrotických procesů jsou rozmanité, a zahrnují změny jako je přeměna epitelových buněk na mezenchymální, indukce apoptózy, aktivace a množení myofibroblastů, což následně podporuje zvýšenou produkci extracelulární matrix. [25]

### 3.3 Zvířecí modely jaterního poškození typu NAFLD/NASH

Ideální zvířecí model NAFLD/NASH by měl odrážet jaterní histopatologii a patofyziologii lidské NAFLD/NASH. Játra zvířecího modelu NASH by proto měla vykazovat steatózu, intralobulární zánět, hepatocelulární balonování a v ideálním případě perisinusoidální fibrózu v zóně 3 a náchylnost k jaterním nádorům. Dále by zvíře mělo vykazovat metabolické abnormality, jako je obezita, inzulinová rezistence, hyperglykémie nalačno, dyslipidémie a změněný adipokinový profil. [3]

Zvířecí modely NAFLD/NASH se dělí na genetické modely, nutriční modely a modely kombinující genetické a nutriční faktory. Dosud bylo popsáno mnoho zvířecích modelů NAFLD/NASH, avšak žádný zvířecí model zcela neodráží jaterní histopatologii a patofyziologii lidské NAFLD/NASH. Proto je důležité vybrat zvířecí model, který nejlépe odpovídá cíli studie. [3]

#### 3.3.1 Genetické modely

K dobrovolnému přejídání dochází u myší s jednotlivými mutacemi genů regulujících chuť k jídlu, zejména ob/ob (deficit leptinu), db/db (deficit leptinové signalizace), foz/foz (spontánní mutace v genu pro Alströmův syndrom 1, který kóduje protein lokalizovaný v centrozomech a neuronálních řasinkách vnímajících chuť k jídlu) a myší s vyřazeným melanokortinovým receptorem 4 (Mc4r-/-), které se podobají obezitě u lidí. To je v kontrastu s lidskou NASH, která se obvykle vyskytuje v kontextu multifaktoriální obezity, kdy různé jednonukleotidové polymorfismy, epigenetické modifikace a faktory prostředí způsobují nadměrnou spotřebu energie. U takových modelů vede vyvážená strava ke steatóze, zatímco ke vzniku NASH je nutná aterogenní strava. Tyto modely se tedy liší od dietních modelů u normálních kmenů větším rozsahem obezity a sklonem k metabolickým

komplikacím, které se vyskytují u lidské NASH. Rozsah fibrózy závisí na kmeni zvířete a délce krmení. [26]

### 3.3.2 Dietní modely

Nadměrné výživy lze dosáhnout použitím vysokotučné diety (high-fat diet), ale u většiny kmenů myší není dosaženo tělesné hmotnosti vyšší než 40 g, což odpovídá obezitě u myší. Dále ani čistě vysokotučná, ani vysokosacharidová dieta nevede k NASH. Úspěšnější dietní strategie zahrnují nadbytek cholesterolu a fruktózy do vysokotučné a vysokosacharidové diety nebo přidávání transmastných kyselin; takové diety se označují jako aterogenní. Obsah cholesterolu v takových dietách se pohybuje od 0,1 % váhy potravy, ale velmi vysoký obsah cholesterolu, nad 0,5 %, je nežádoucí, protože je toxický a vysoce převyšuje lidskou spotřebu. [26]

Nežádoucí však je, že do 8 týdnů myši ztratí asi 40 % své hmotnosti, pravděpodobně v důsledku hypermetabolického stavu. Nemají zbytky tukové tkáně a vykazují periferní inzulínovou senzitivitu s nízkou hladinou inzulínu v séru, přestože biochemicky prokazují jaterní inzulínovou rezistenci. Navíc u nich není patrné balónování hepatocytů. K překonání úbytku hmotnosti a snížení citlivosti na inzulín se kombinuje více modelů jak dietních, tak genetických. [26]

### 3.3.3 CDAA model

CDAA dieta (choline deficient, L-amino acid defined, high-fat diet) je speciální typ stravy s nedostatkem cholinu a aminokyselin. Model CDAA je zodpovědný za přírůstek hmotnosti, steatohepatitidu s mírným balónováním a trojnásobné zvýšení jaterního kolagenu po 12 týdnech s progresí do pokročilého stadia fibrózy a jaterní cirhózy po 30 týdnech. [26]

Tato dieta obsahuje vysoké množství sacharózy a tuku (40 % sacharózy, 10 % tuku), ale chybí jí methionin a cholin, které jsou nezbytné pro jaterní  $\beta$ -oxidaci a produkci VLDL. Nedostatek cholinu navíc zhoršuje jaterní sekreci VLDL. Výsledkem je ukládání lipidů v játrech, dále dochází k oxidačnímu stresu a změnám cytokinů a adipocytokinů, což přispívá k poškození jater. [3]

Sérová hladina alaninaminotransferázy (ALT) se po podávání CDAA diety u myší trvale zvyšuje. Steatohepatitida se objevuje v 10. dni a perisinusoidální fibróza je u myší pozorována do 8-10 týdnů. Po 10. týdnu krmení CDAA dietou je u myší

pozorována rozsáhlá makrovesikulární steatóza ve všech oblastech s výjimkou periportální oblasti a mnoho nekroinflammatorních ložisek obsahujících lymfocyty a neutrofilny. [3]

Ačkoli model CDAA způsobuje závažnější zánět a fibrogenezi než jiné zvířecí nutriční modely NASH, závažnost NASH u hlodavců krmených touto dietou může záviset na druhu, pohlaví a kmeni zvířete. Hlavní nevýhodou modelu CDAA je, že metabolický profil modelu je opačný než u typické lidské NASH. Konkrétně myši krmené touto dietou vykazují výrazný úbytek hmotnosti (často více než 20% úbytek hmotnosti po 3 týdnech), nízkou hladinu cukru v krvi nalačno, periferní citlivost na inzulin, nízké sérové hladiny inzulinu a leptinu a nezměněné nebo zvýšené sérové hladiny adiponektinu. Pro zlepšení těchto problémů se tato dieta kombinuje s genetickými modely, a jako zvířata krmená CDAA se příležitostně používají geneticky obézní myši, jako jsou myši ob/ob a db/db. Hlavními výhodami CDAA diety jsou její snadné získání a použití. [3]

### 3.4 Endoglin jako potenciální terapeutický cíl

Endoglin je membránový glykoprotein, který funguje jako koreceptor pro TGF- $\beta$ , přičemž současně moduluje jeho signalizaci. Existují dvě hlavní formy endoglinu: membránová forma, exprimovaná různými typy buněk, a rozpustná forma, která cirkuluje v plazmě nebo je přítomna v médiu buněčných kultur. Endoglin je exprimován v endotelových buňkách, hladkých svalových buňkách cév, fibroblastech, jaterních hvězdicovitých buňkách a aktivovaných makrofázích. [27]

V současnosti jsou poznatky o regulaci exprese membránového endoglinu a hladin rozpustného endoglinu v souvislosti s funkcí jater a patologií omezené. Zvýšená exprese endoglinu v játrech byla spojena s rozvojem jaterní fibrózy a bylo zjištěno, že dochází k nárůstu exprese v aktivovaných jaterních hvězdicovitých buňkách. Také byly zaznamenány významně zvýšené hladiny rozpustného endoglinu u pacientů s různými jaterními chorobami, včetně NASH. [27]

Endoglin hraje roli v NASH prostřednictvím různých mechanismů, včetně regulace signalizace TGF- $\beta$ , která má vliv na fibrotizaci, a může také ovlivňovat tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů, což přispívá k patogenezi onemocnění.

Vyšší hladiny endoglinu mohou dále zhoršovat stav jater tím, že narušují jejich obranný mechanismus proti nadměrné akumulaci tuků. [27]

Z tohoto důvodu je endoglin považován za potenciální biomarker pro vývoj a progresi NASH. Dále se zkoumá jeho potenciál jako terapeutického cíle, který by mohl ovlivnit progresi jaterní fibrózy a metabolické poruchy spojené s NASH. [27]

Byly provedeny studie využívající anti-endoglinové protilátky, která jsou specificky namířené právě proti endoglinu. Velmi slibné účinky byly pozorovány u protilátky carotuximab (TRC105), která byla úspěšně použita i v klinických studiích pro léčbu onkologických onemocnění. Další protilátkou je M1043, která je předmětem nových studií. Pokud by se ukázalo, že M1043 ovlivňuje tyto procesy, mohla by představovat nový způsob pozitivního ovlivnění NASH. [28]

### 3.5 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je technika, která využívá specifické vazby mezi protilátkou a antigenem k detekci a lokalizaci specifických antigenů v buňkách a tkáních. Vzniklé imunokomplexy se nejčastěji detekují a hodnotí světelným mikroskopem. IHC je standardním nástrojem v mnoha oblastech výzkumu a stala se základní pomocnou technikou v klinické diagnostice v anatomické patologii. Metoda se často používá jako pomoc při klasifikaci nádorů, určení místa původu metastazujícího nádoru a detekci drobných ložisek nádorových buněk, která jsou při běžném barvení hematoxylinem a eozinem špatně viditelná. Metoda se nejčastěji provádí na tkáni fixované formalínem a zalité do parafínu, jejíž výhodou je snadné skladování, ačkoli byla původně vyvinuta pro zmrazené řezy. [29]

Na rozdíl od jiných formátů imunoanalýzy, jako je western blot a ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), které poskytují kvalitativní a kvantitativní informace o cílových molekulách, jež jsou vyjmuty ze svého normálního biologického umístění, IHC umožňuje kvalitativně a kvantitativně analyzovat cílové molekuly *in situ*, a tím poskytuje informace o těchto složkách v jejich normálním (nebo postiženém) histologickém kontextu. [30]

### 3.5.1 Princip metody

#### 3.5.1.1 Příprava tkání

Správná manipulace s tkání a její příprava je rozhodující pro získání spolehlivého výsledku barvení. Tkáně nebo orgány, které jsou předmětem zájmu, se nejprve fixují ve formalínu, ten ale není jediné fixační činidlo používané při imunohistochemii. V závislosti na typu vzorku a citlivosti cílových epitopů lze použít i jiné aldehydy, alkoholové roztoky nebo zmrazení v kryoprotektivním roztoku. [30]

Po fixaci se tkáně zalijí parafínu a utvoří se tak bločky, které se poté pomocí mikrotomu rozřežou na velmi tenké řezy o tloušťce přibližně 4-5  $\mu\text{m}$ . Rozřezané tkáně se upevní na skleněná sklíčka, která jsou potažena tkáňovým lepidlem. Před dalším zpracováním se sklíčka vysuší. [30]

#### 3.5.1.2 Odhalování antigenních epitopů (*antigen retrieval*)

Formalínem vyvolané zesíťování molekul proteinů nebo dlouhodobá fixace obecně mohou maskovat určité epitopy a bránit tak vazbě protilátek v následujících krocích. Cílem vyhledávání epitopů je tyto epitopy odmaskovat nebo znovu odhalit. Zde lze použít řadu strategií. Obvykle se používá ošetření trávicími enzymy, teplem nebo detergenty nebo kombinace těchto tří možností. [30]

#### 3.5.1.3 Blokování nespecifických vazeb

Před přidáním primární protilátky se zablokují vazebná místa, která nejsou primárním cílem metody. Toho se dosáhne inkubací v pufru obsahujícím sérum, sušené odtučněné mléko, hovězí sérový albumin nebo jiné blokovací činidlo. [30]

#### 3.5.1.4 Primární protilátka

V tomto kroku se aplikuje primární protilátka specifická pro cílový epitop. Primární protilátky pro imunohistochemii by měly být vysoce specifické a měly by lehce pronikat do cílové tkáně. Méně specifické protilátky vážou navíc i necílové epitopy, což vede k falešně pozitivním signálům v pozadí, které mohou významně interferovat. [30]

Možnost využití monoklonálních nebo polyklonálních protilátek přináší různé výhody a nevýhody. Polyklonální protilátky jsou schopny vázat mnoho epitopů na stejném cílovém proteinu, což zvyšuje jejich účinnost. Nicméně tato schopnost může vést k nižší specifičnosti a vázání na nechtěné cíle. Naopak, monoklonální protilátky



vážou pouze jeden epitop, což zvyšuje jejich specifičnost, avšak nemusí být ideální pro cíle s nízkým počtem epitopů. [30]

Bez ohledu na typ použité protilátky je nezbytné optimalizovat její koncentraci pro každý nový test, tj. pokaždé, když je použit nový typ vzorku nebo tkáň. Důkladná optimalizace tohoto procesu je u imunohistochemie zásadní, protože úspěch primární protilátky závisí nejen na její specifitě a afinitě k cíli, ale také na množství a dostupnosti epitopů na cílovém i vedlejším místě ve vzorku. [30]

Příliš vysoká koncentrace protilátky může zvýšit pozadí signálu, pokud jsou cílové epitopy přesyceny navázanou protilátkou. Použití nižší koncentrace primární protilátky může tento problém zmírnit, avšak za cenu snížené intenzity signálu, a u protilátek s nízkou afinitou může vést k falešně negativním výsledkům. Nenavázaná primární protilátka se odstraní opláchnutím sklíček vhodným promývacím roztokem, obvykle obsahujícím stopové množství detergentu a solí. [30]

#### *3.5.1.5 Detekce*

Během detekce je primární interakce mezi protilátkou a epitopem lokalizována a vizualizována jako měřitelný signál. Existují různé metody detekce, ale nejčastěji používané jsou metody založené na značených protilátkách. Ty lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: přímé a nepřímé. Rozdělení závisí na tom, zda je primární protilátka přímo konjugována s enzymem nebo fluorescenční značkou (přímá detekce), nebo zda se používá sekundární protilátka konjugovaná s enzymem nebo fluorochromem (nepřímá detekce). Výběr vhodné metody detekce závisí na očekávané úrovni exprese cíle, jeho dostupnosti, požadovaném typu odečítání a dostupném vybavení. [30]

Při přímé detekci je primární protilátka značena enzymem nebo fluorochromem a signál je generován po přidání substrátu nebo po excitaci fluorochromu. Metody nepřímé detekce často využívají interakce mezi biotinem a jeho vazebnými partnery, jako je strept(avidin), ke zvýšení citlivosti detekce. V této metodě se po odstranění nenavázaných primárních protilátek aplikuje biotinylovaná sekundární protilátka a její lokalizace v cílovém místě se provádí pomocí komplexu avidin-biotin enzymu (ABC komplex), který po přidání vhodného substrátu

diaminobenzidinu (DAB) utváří nerozpustnou barevnou sraženinu. Protože každá molekula biotinu může vázat více molekul avidinu, detekční signál je zesílen. [30]

Pokud je preferována fluorescenční detekce, použije se fluorescenčně značený avidin nebo enzym k vytvoření fluorescenčního signálu. Kvůli endogennímu biotinu, který může způsobit problémy s pozadím při barvení IHC, se někdy volí metoda detekce na bázi polymeru místo avidin-biotin systému. V této metodě je sekundární protilátka přímo spojena s polymerem enzymů namísto jediného enzymu. Díky tomu, že každá sekundární protilátka je spojena s několika enzymy, signál z každé primární interakce mezi protilátkou a antigenem je výrazně zesílen, což zvyšuje citlivost testu. [30]

#### *3.5.1.6 Kontrastní barvení*

Jakmile je barvení dokončeno, tj. po detekci, je často výhodné zahrnout kontrastní barvení ke zvýšení kontrastu mezi obarvenými a neobarvenými oblastmi v řezu tkáně, což usnadňuje přesné určení sledovaných histologických znaků. Existuje řada kontrastních barviv, některé z nich jsou specifické pro buněčné struktury. Hematoxylin se nejčastěji používá pro vzorky fixované ve formaldehydu a zalité parafínem, pokud se používají detekční metody založené na světelné mikroskopii. Hematoxylin barví cytoplazmu bledě modře a jádra tmavě modře. Při použití fluorescenční detekce se používají fluorescenční barviva, která se selektivně vážou na nukleové kyseliny. [30]

Po kontrastním barvení se na obarvená sklíčka nanasou krycí sklíčka a montují se vhodným médiem.

#### *3.5.1.7 Analýza obrazu*

Podle zvoleného detekčního formátu jsou vzorky vizualizovány buď světelnou nebo fluorescenční mikroskopii. Pro dosažení vyšších detailů a lepšího zobrazení je také možné zvolit konfokální mikroskopii. [30]

## 4. Experimentální část

### 4.1 Experimentální zvířata

V experimentu byli použiti samci myšího kmene C57BL/6J ve věku 10 týdnů. Během 8 týdnů byly myši krmeny dietou CDAA-HFD. Tyto myši byly rozděleny do dvou skupin: CDAA+IgG (n=8) a CDAA+M1043 (n=8). Po uplynutí čtyř týdnů začala u obou skupin intraperitoneální aplikace IgG nebo M1043, první skupině byla aplikována potkaní protilátka IgG (10 mg/kg) a druhé skupině monoklonální anti-endoglinová protilátka M1043 (10 mg/kg) dvakrát týdně až do konce experimentu. Skupina s potkaní IgG sloužila jako kontrolní.

Zvířata byla chována ve Viváriu FaF UK HK, kde měla volný přístup k vodě a potravě. Po skončení experimentu byla usmrcena v hluboké narkóze. Byla jim odebrána krev z vena cava inferior a následně byly vyjmuty játra. Část jater byla zpracována pro histologické hodnocení.

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

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Příprava parafinových řezů

Biologický materiál, v tomto případě myší játra, se ihned po odběru fixuje ve 4% roztoku paraformaldehydu, čímž se předchází poškození a znehodnocení vzorků. Fixovaný materiál se poté zalévá do zalévacího média, aby bylo možné z něj zhotovit tenké řezy na mikrotomu. Jako zalévací médium se nejčastěji používá parafín.

Jelikož je parafín médium nemísitelné s vodou, je třeba tkáň před zalitím odvodnit. To se provádí za použití alkoholových lázní obsahujících koncentrovaný ethanol o stoupající koncentraci od 70 % až do 96 %. Po odvodnění je nutné tkáň projasnit rozpouštědlem, které je mísitelné se zalévacím médiem, tedy s parafínem. K tomu se nejčastěji používají lázně s xylenem nebo benzenem. Během projasnění se tkáň zprůsvitní, někdy až zprůhlední.

Takto projasněná tkáň se zalije roztaveným parafínem. Roztavený parafín musí mít teplotu mezi 52 a 60 °C, aby byl tekutý, ale ne moc horký, aby se vysokou teplotou tkáň nepoškodila. Po zalití do parafínu se nechá celý parafínový bloček řádně zatuhnout a po zatuhnutí se může krájet.

Krájení se provádí na mikrotomu, k této práci byl použit automatický diskový mikrotom (Leica DSC1). Aby byly řezy rovnoměrně tenké a nepoškozené, je nutné krájet bloček co nejvíce tuhý, ideální je tedy uchovávat jej v chladničkové teplotě, a zároveň používat velice ostrý žiletkový nůž, aby se řez při krájení nepotrhal.

Před samotným krájením se mikrotom musí nechat nakalibrovat, aby si nastavil ideální pozici bločku a nože. Před samotným zhotovením jednotlivých řezů se musí ještě bloček s tkání nechat takzvaně přikrojit, aby byla plocha pro krájení hladká a aby se krájela celá tkáň. Pomocí ovládacího panelu se na mikrotomu nastaví požadovaná tloušťka řezu, tzn. 4,5 μm. Ukrojené řezy se poté pomocí pinzety nebo jiného vhodného nástroje přenesou na podložní sklíčko s kapkou destilované vody. Díky této kapce se řez rovnoměrně napne a nebude pomačkaný. Podložní sklíčka s řezy se potom položí na rozehřátou plotýnku, aby se vysušila použitá kapka vody a řezy se tak pevně přilepily na sklíčko. Po vysušení se dají tyto preparáty před barvením bezpečně skladovat.

#### 4.2.2 Barvení preparátů

Pro tuto práci bylo použito imunohistochemické barvení, tzn. během barvení byla použita značená protilátka, která se navázala na antigen v řezu za vzniku komplexu, a po přidání substrátu vznikla v místě komplexu barevná reakce. Náhodným výběrem vybrané preparáty byly použity k imunohistochemické detekci protilátek anti-ICAM-1 a anti-galektin-3.

##### 4.2.2.1 Postup práce

Před samotným barvením je potřeba tkáň odparafínovat a zavodnit, jelikož většina používaných reagensů je mísitelná s vodou a přes parafín by do tkáně nemohly pronikat. Před samotným zavodněním se tkáň ještě znovu projasňuje za použití xylenu, a samotná deparafinace se provádí použitím alkoholových lázní, tentokrát ale s klesající koncentrací etanolu od 96 % do 70 %.

Po zavodnění se preparáty nechají permeabilizovat v roztoku 0,1% Tritonu X-100 v PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok). Tento krok je důležitý pro vstup protilátek skrz buněčné membrány v dalších bodech. Mezi každým krokem se preparáty oplachují v PBS. Poté následuje odkrytí antigenních epitopů (antigen retrieval), to se provádí vařením v citrátovém pufru (pH=6) po dobu 20 minut. Po oplachu v PBS se řez osuší a kolem něj se namaluje kruh pomocí DAKO PEN. Tento kruh vytváří bariéru proti tekutinám, které se aplikují na řezy. Potom se preparáty umístí na 5 minut do 3% roztoku peroxidu vodíku, opláchnou se a aplikuje se na ně blokovací roztok 5% mléka v PBS po dobu 1 hodiny. Následně se vše opláchnou opět v PBS, osuší a na osušené sklíčko se aplikuje samotná protilátka (anti-ICAM-1 a anti-galektin-3), která se naváže na antigeny sledovaných markerů. Příprava protilátky je odlišná pro jednotlivé markery – pro marker ICAM-1 (RnD #AF796) se použije protilátka ředěná v poměru 1:50 v 2,5% koňském séru. Pro galektin-3 (InVitrogen #14-5301-82) je použité ředění 1:250 v 5% mléce. Řezy s protilátkou se nechají inkubovat přes noc v lednici při 4°C.

Další den se sklíčka opláchnou v PBS od přebytečné protilátky a aplikuje se sekundární značená (biotinylovaná) protilátka. Pro ICAM-1 je značenou protilátkou anti-goat, ředěná v poměru 1:200 v PBS. Pro galektin-3 je použita sekundární protilátka anti-rat se stejným ředěním. Sekundární protilátka se nechá působit 30 minut, poté se preparáty opět opláchnou, usuší a aplikuje se na ně avidin-biotin komplex (ABC) na dalších 30 minut. Avidin z tohoto komplexu se naváže na sekundární protilátku, jež je navázána na protilátku primární. Na avidin se pak naváže biotinylovaná křenová peroxidáza. Pomocí PBS se opláchnou přebytek protilátky a aplikuje se substrát diaminobenzidin (DAB), který v reakci s křenovou peroxidázou vytvoří barevnou reakci. V tomto kroku je důležité dodržet přesný čas působení DAB, to znamená 1 minutu a 30 sekund u markeru ICAM-1 a 2 minuty u galektinu-3. Po uplynutí této doby se řezy přesouvají do destilované vody a následně na 45 sekund do hematoxylinu, aby se obarvila jádra buněk. Poté se preparáty nechají oplachovat pod tekoucí kohoutkovou vodou, to způsobí zmodrání jader, a ke konci už zbývá preparáty opět odvodnit, tentokrát pomocí acetonu a xylenu, a zamontovat pomocí vhodného média. Pro tuto práci byl použit Eukitt.

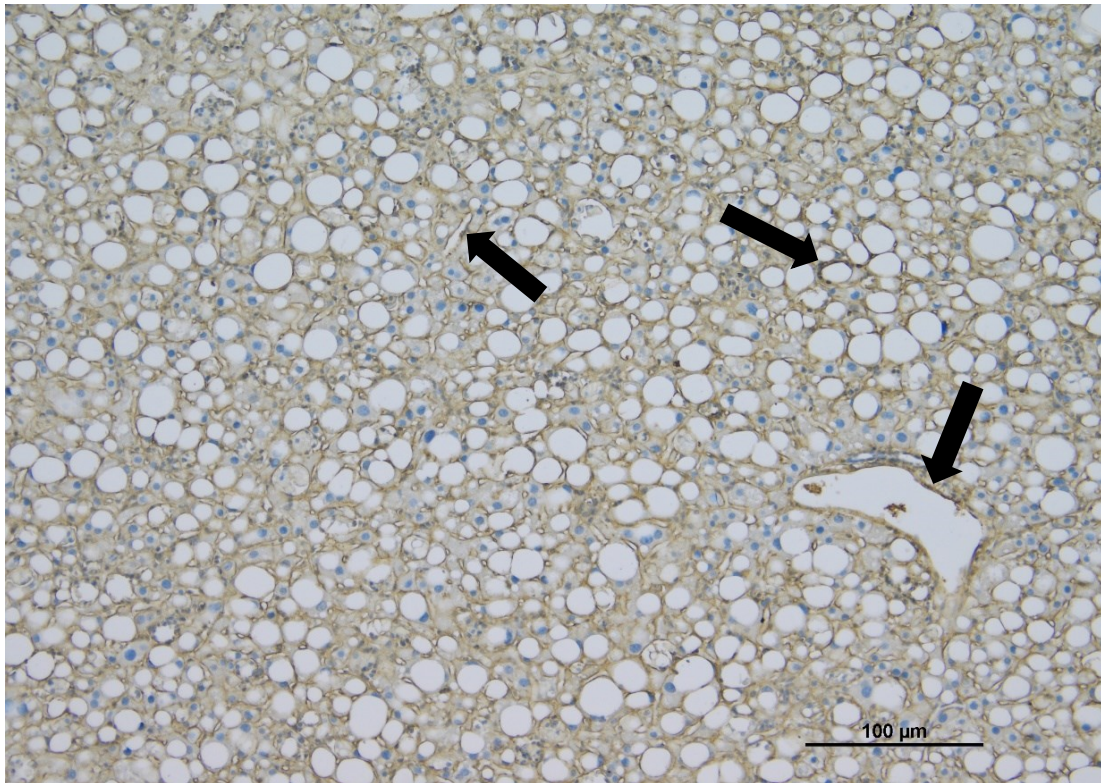
Preparáty byly hodnoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus AX70 a fotografie byly pořízeny za pomoci digitální kamery Pixelink PL-A642.

## 5. Výsledky

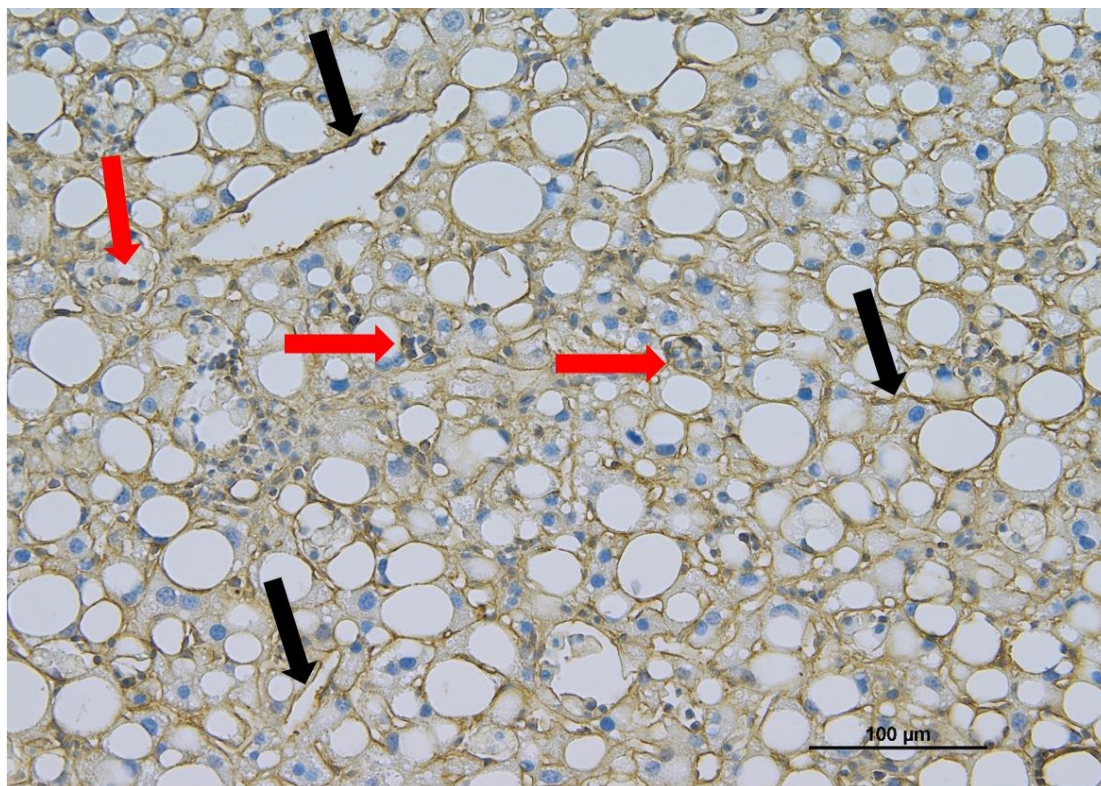
Podávání vysokotukové diety vedlo k rozvoji výrazné makrovesikulární steatózy v hepatocytech a zánětu v jaterní tkáni (Obr. 11-18).

Výsledky IHC barvení ukazují expresi ICAM-1 zejména v endotelových buňkách krevních cév (Obr. 11-14). Při porovnání skupin s aplikací IgG (Obr. 11-12) a M1043 (Obr. 13-14) jsme nezaznamenali změny v rozsahu a intenzitě barevné reakce. Zdá se, že v některých případech je barevná reakce lokalizována mimo cévní endotel a předpokládáme, že tyto buňky představují aktivované hvězdicovité buňky.

Expresi galektinu-3, která je specifická pro makrofágy, jsme zaznamenali výrazně ve skupinách makrofágů zejména na periférii lalůček centrální vény (Obr. 15-18), v centru se tyto buňky vyskytovaly spíše jednotlivě. Ani u tohoto markeru jsme nezaznamenali rozdíl v rozsahu a intenzitě výsledné barevné reakce mezi skupinou s podáváním IgG (Obr. 15-16) a skupinou s podáváním M1043 (Obr. 17-18).

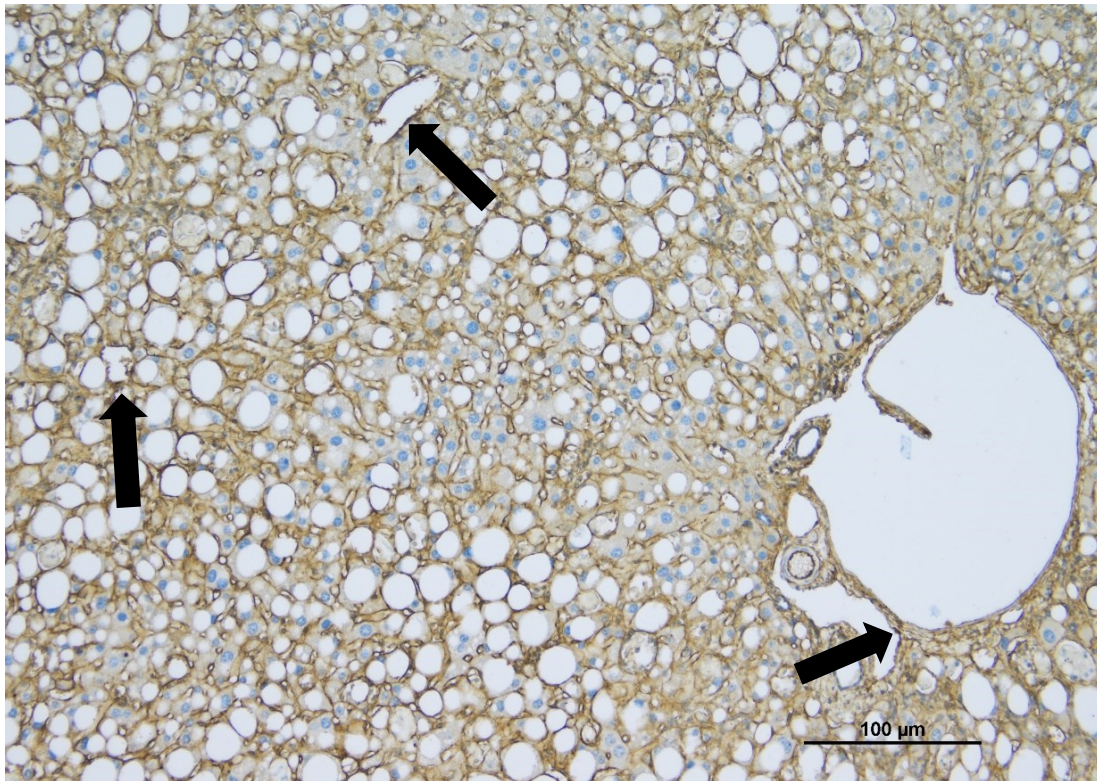


Obrázek 11 Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+IgG, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), zvětšení 100x

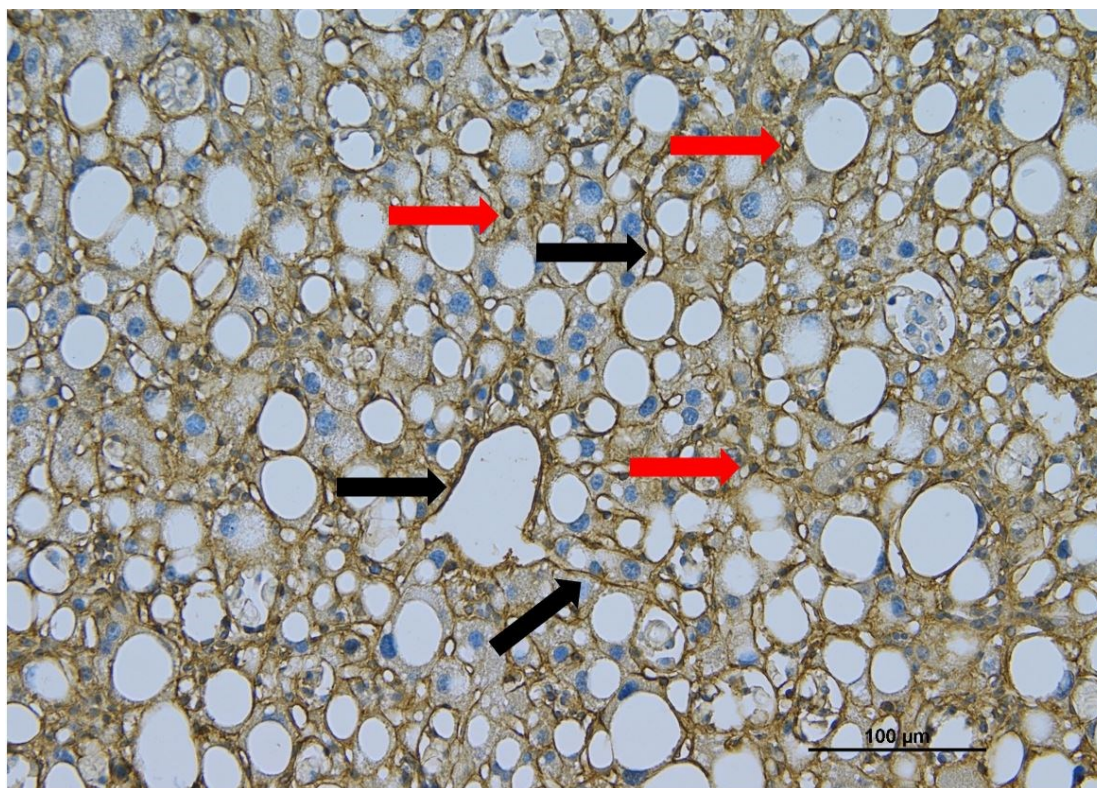


Obrázek 12 Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+IgG, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), exprese v aktivovaných jaterních hvězdčicovitých buňkách (červená šipka), zvětšení 200x

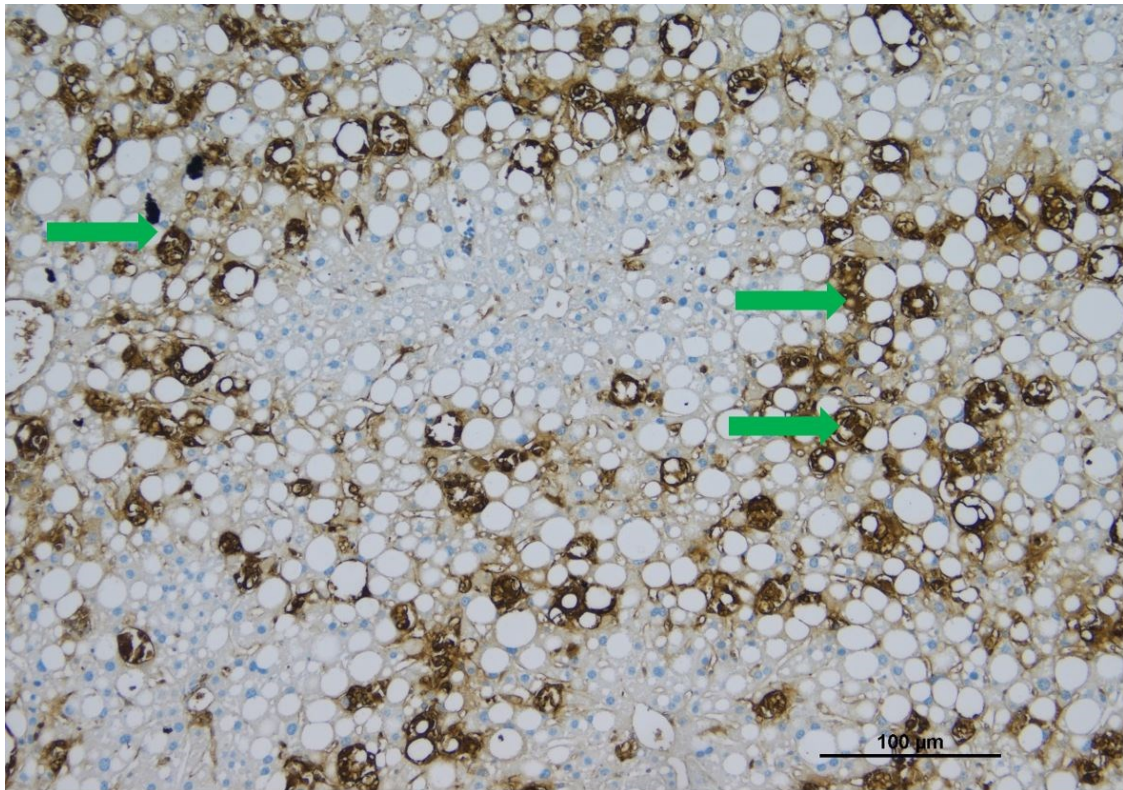




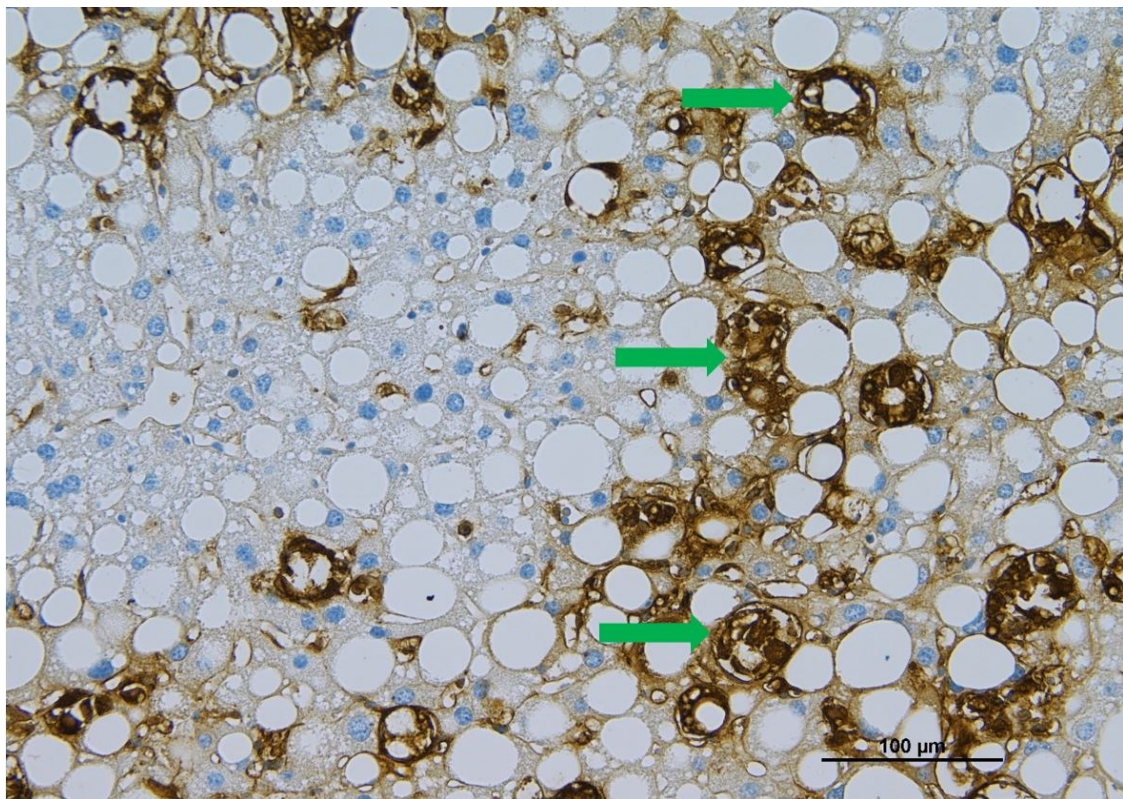
Obrázek 13 Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+M1043, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), zvětšení 100x



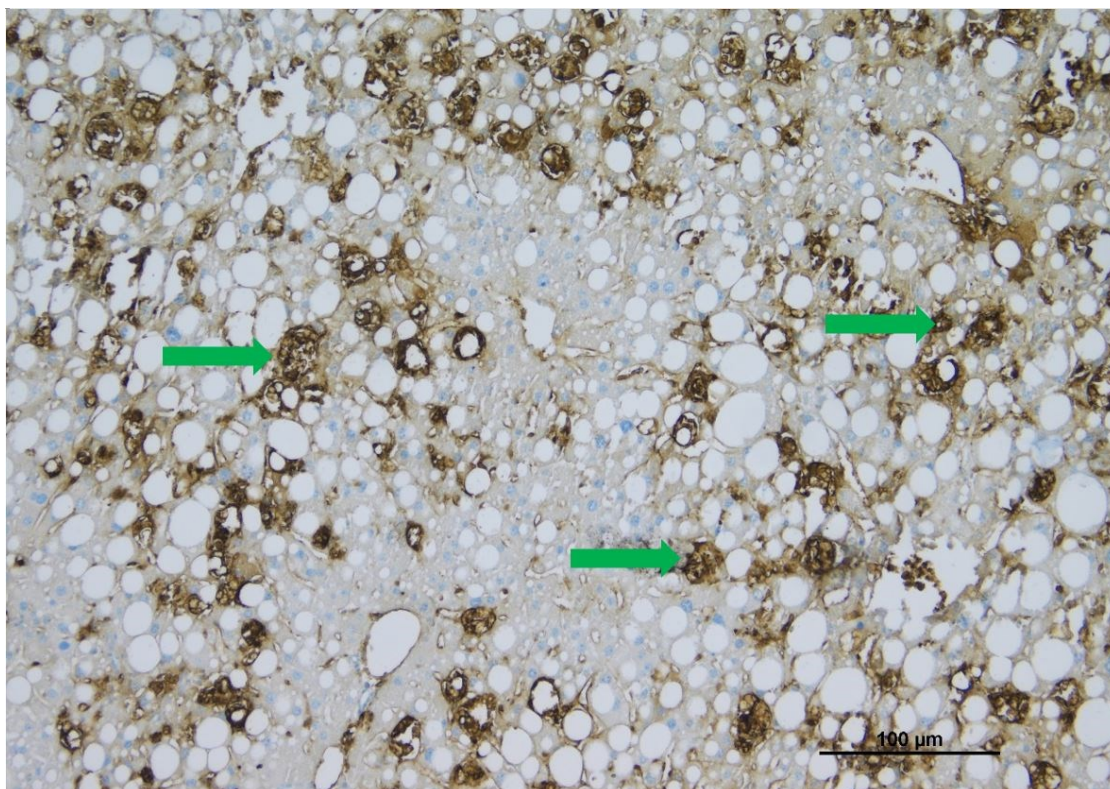
Obrázek 14 Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+M1043, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), exprese v aktivovaných jaterních hvězdčicovitých buňkách (červená šipka), zvětšení 200x



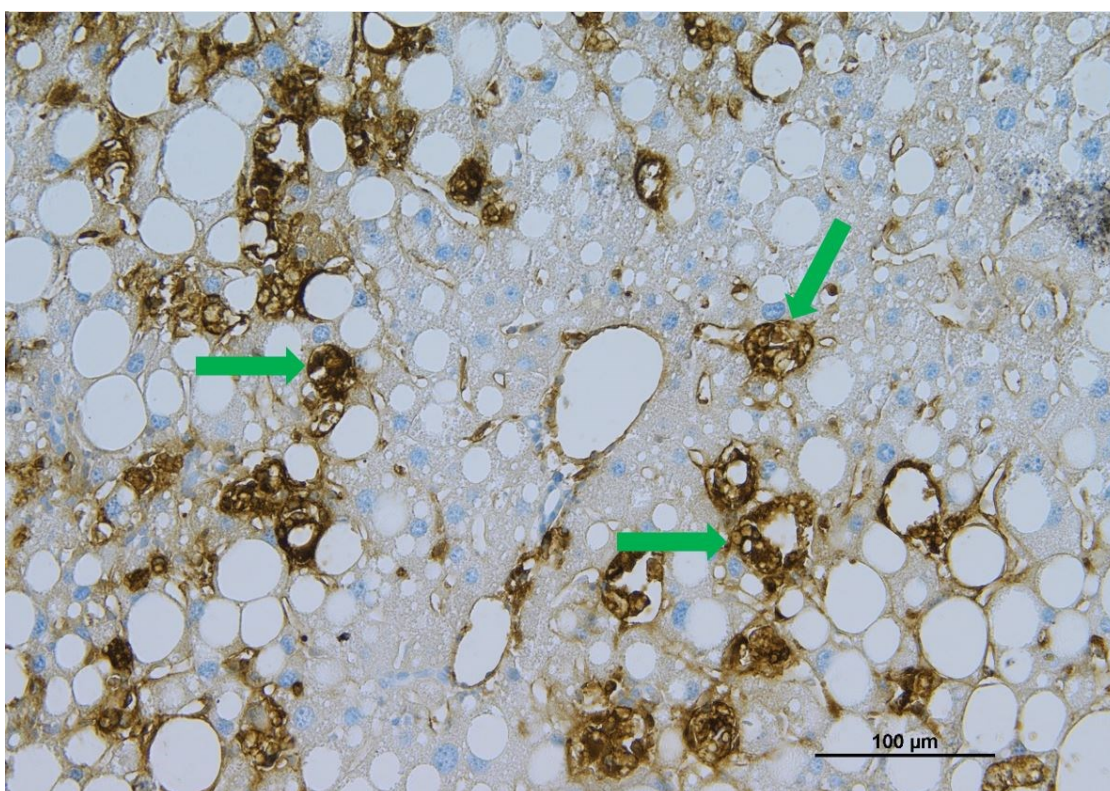
Obrázek 15 Repräsentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+IgG, exprese v makrofázích (zelená šipka), zvětšení 100x



Obrázek 16 Repräsentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+IgG, exprese v makrofázích (zelená šipka), zvětšení 200x



Obrázek 17 Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+M1043, exprese v makrofázích (zelená šipka), zvětšení 100x



Obrázek 18 Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+M1043, exprese v makrofázích (zelená šipka), zvětšení 200x

## 6. Diskuse

Nealkoholické ztukovatění jater (NAFLD) je onemocnění charakterizováno ektopickým hromaděním tuku v játrech, přičemž pokud není přítomna žádná jiná zjevná příčina tohoto jevu, nazývá se to jaterní steatóza. NAFLD zahrnuje nejen samotné ztukovatění jater, ale také nealkoholickou steatohepatitidu (NASH), která se diagnostikuje na základě zánětlivé aktivity a poškození hepatocytů ve steatotické jaterní tkáni. Etiologie NAFLD a NASH je spojena například s metabolickým syndromem, obezitou, diabetes mellitus 2. typu a dalšími metabolickými a genetickými stavy. [2]

Nadměrné hromaděním lipidů v játrech vyvolává poškození hepatocytů, spouštějící zánětlivou reakci, která dále zhoršuje průběh onemocnění a podporuje další aktivaci zánětu. Makrofágy, jako Kupfferovy buňky, dendritické buňky a neutrofilů, hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi a patogenezi zánětu jater. Tyto buňky nejen fagocytují a ničí cizorodé látky, ale také produkují prozánětlivé cytokiny, jako TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které podporují zánětlivou reakci. [20]

Aktivované buňky exprimují receptory, jako jsou TLR a NLR, které rozpoznávají molekuly zvané PAMP a DAMP, spouštějící iniciaci zánětu. Tyto procesy vedou k fibróze jater a mohou vést k vážným následkům, jako je cirhóza a hepatocelulární karcinom. Jaterní zánět může být monitorován pomocí různých laboratorních markerů, včetně ICAM-1 a galektinu-3, které hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi a zánětlivých procesech. [20]

S rozvojem jaterního poškození, zejména fibrózy je spojována i zvýšená exprese glykoproteinu endoglinu, který se zdá být nejen slibným markerem, ale i potenciálním terapeutickým cílem pro ovlivnění rozvoje NASH. [27] Po úspěchu s použitím monoklonální anti-endoglinové protilátky carotuximabu (TRC105) v léčbě některých nádorových onemocnění byla patentována další protilátka M1043. [28] Sledování účinků M1043 na zánětlivou reakci v jaterní tkáni, která je součástí NASH bylo předmětem i naší studie.

Podávání vysokotukové diety experimentálním myším vedlo k významnému rozvoji makrovesikulární steatózy v hepatocytech a zánětu v jaterní tkáni. Výsledky imunohistochemického barvení ukazují, že ICAM-1 je exprimována především v

endotelových buňkách krevních cév. Při porovnání skupin s aplikací kontrolního IgG a anti-endoglinové protilátky M1043 nebyly pozorovány významné změny v rozsahu a intenzitě ICAM-1 barvení. V některých případech byla barevná reakce lokalizována i mimo cévní endotel, a zde předpokládáme, že se jedná o jaterní hvězdčité buňky v souladu s některými autory [31]. Expresi galektinu-3, specifického pro makrofágy, jsme pozorovali převážně ve skupinách makrofágů především na periférii lalůček centrálních žil. Ani zde jsme nezaznamenali rozdíl v rozsahu a intenzitě výsledné barevné reakce mezi sledovanými skupinami.

Výsledky barvení tedy poukazují na to, že anti-endoglinová protilátka M1043 nemá vliv na zánět u NASH. Tyto výsledky je však potřeba doplnit o další analýzy, jako například western blot nebo imunofluorescence.

## 7. Závěr

Výsledky naší práce ukazují, že podávání vysokotukové diety vyvolalo výraznou makrovesikulární steatózu v hepatocytech a zánět v jaterní tkáni. Imunohistochemické barvení potvrdilo přítomnost ICAM-1 v endotelových buňkách krevních cév, nicméně porovnání skupin s aplikací IgG a M1043 neprokázalo signifikantní změny v rozsahu a intenzitě barevné reakce. V některých případech byla barevná reakce zaznamenána i mimo cévní endotel, což naznačuje aktivaci hvězdícovitých buněk. Expresi galektinu-3, specifického pro makrofágy, jsme pozorovali především ve skupinách makrofágů na periférii lalůčku centrální vény, přičemž rozdíly v rozsahu a intenzitě výsledné barevné reakce mezi skupinami taktéž nebyly zaznamenány. Tyto výsledky naznačují, že testovaná anti-endoglinová protilátka M1043 pravděpodobně neovlivňuje zánět u NASH.

## 8. Seznam použitých zkratek

ABC komplex	avidin-biotin komplex
$\alpha$ SMA	$\alpha$ hladkosvalový aktin
ALT	alaninaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
CDAА	choline deficient, L-amino acid diet
CYP450	cytochrom P450
DAB	diaminobenzidin
DAMP	damage-associated molecular patterns
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HSC	jaterní hvězdicovitá buňka
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula 1
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IHC	imunohistochemie
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
IL-12	interleukin 12
IL-18	interleukin 18
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCP-2	monocyte chemoattractant protein-2
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIP-1	macrophage inflammatory protein-1
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
NAFLD	nealkoholické ztukovatění jater
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NK buňky	natural killer buňky

NKT buňky	natural killer T buňky
NLR	nod-like receptor
PAMP	patogen-associated molecular patterns
PRR	pattern recognition receptory
T3	trijodtyronin
T4	tyroxin
TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$
TLR	toll-like receptor
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou



## 9. Seznam použitých obrázků

Obrázek 1	Uspořádání jaterní tkáně. Převzato z [6] .....	4
Obrázek 2	Uspořádání hepatocytů. Převzato z [7] .....	5
Obrázek 3	Zóny jaterního acinu. Převzato z [9].....	6
Obrázek 4	Kupfferovy buňky. Převzato z [11].....	6
Obrázek 5	Itovy buňky. Převzato z [13] .....	8
Obrázek 6	Aktivované HSC. Převzato z [14].....	9
Obrázek 7	Spojení NASH a obezity. Převzato z [17].....	14
Obrázek 8	Steatóza. Převzato z [18].....	15
Obrázek 9	Progrese NAFLD. Převzato z [19] .....	16
Obrázek 10	Aktivace Kupfferových buněk PAMP/DAMP. Převzato z [22].....	17
Obrázek 11	Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+IgG, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), zvětšení 100x.....	33
Obrázek 12	Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+IgG, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), exprese v jaterních hvězdicovitých buňkách (červená šipka), zvětšení 200x .....	33
Obrázek 13	Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+M1043, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), zvětšení 100x.....	34
Obrázek 14	Reprezentativní fotografie exprese ICAM-1 ve skupině CDAA+M1043, exprese v endotelových buňkách (černá šipka), exprese v jaterních hvězdicovitých buňkách (červená šipka), zvětšení 200x .....	34
Obrázek 15	Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+IgG (zelená šipka), zvětšení 100x.....	35
Obrázek 16	Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+IgG (zelená šipka), zvětšení 200x.....	35
Obrázek 17	Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+M1043 (zelená šipka), zvětšení 100x .....	36
Obrázek 18	Reprezentativní fotografie exprese galektinu-3 ve skupině CDAA+M1043 (zelená šipka), zvětšení 200x .....	36

## 10. Použitá literatura

- [1] E. Trefts, M. Gannon, and D. H. Wasserman, 'The liver', *Current Biology*, vol. 27, no. 21. Cell Press, pp. R1147–R1151, Nov. 06, 2017. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [2] B. Sharma and S. John, *Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)*. 2024. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470243/>
- [3] Y. Takahashi, Y. Soejima, and T. Fukusato, 'Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 18, no. 19. Baishideng Publishing Group Co, pp. 2300–2308, 2012. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2300.
- [4] Praveen Deepak, 'MAMMALIAN HISTOLOGY-LIVER', Jehanabad, Sep. 2020. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: [https://www.sscollegejehanabad.org/study-material/1578244136Mammalian%20histology%20-%20Liver%20\(pg\)\\_Histology\\_Zoology\\_Praveen.pdf](https://www.sscollegejehanabad.org/study-material/1578244136Mammalian%20histology%20-%20Liver%20(pg)_Histology_Zoology_Praveen.pdf)
- [5] M. Krishna, 'Microscopic anatomy of the liver', *Clinical Liver Disease*, vol. 2, no. SUPPL. 1. John Wiley and Sons Inc., 2013. doi: 10.1002/cld.147.
- [6] Josef Fontana, Martina Šajdlíková, and Patrik Maďa, 'Funkce buněk a lidského těla', *Játra a biotransformace xenobiotik*. 2014. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>
- [7] Faculty of Biology. University of Vigo, 'Atlas of plant and animal histology'. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/hepatocito.php>
- [8] R. Williams, 'Sherlock's disease of the liver and biliary systems', *Clinical Medicine*, vol. 11, no. 5, pp. 15–15, Oct. 2011, doi: 10.7861/clinmedicine.11-5-506.
- [9] Phoenix Bell, 'Normal Liver Histology 101'. Jun. 12, 2020. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.aasld.org/liver-fellow-network/core-series/pathology-pearls/normal-liver-histology-101>
- [10] A. T. Nguyen-Lefebvre and A. Horuzsko, 'Kupffer Cell Metabolism and Function'. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4771376/pdf/nihms721865.pdf>
- [11] Southern Illionis University, 'Liver, sinusoids with Kupffer cells'. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://histology.siu.edu/erg/GI166b.htm>

- [12] M. L. Hautekeete and A. Geerts, 'The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease', 1997. doi: 10.1007/BF01324802.
- [13] J. Sato *et al.*, 'Histopathology of Incidental Findings in Beagles Used in Toxicity Studies', *J Toxicol Pathol*, vol. 25, no. 1, pp. 103–134, 2012, doi: 10.1293/tox.25.103.
- [14] I. Mannaerts *et al.*, 'The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation', *J Hepatol*, vol. 63, no. 3, pp. 679–688, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.011.
- [15] E. Wisse, D. Luo, D. Vermijlen, C. Kanellopoulou, R. de Zanger, and F. Braet, 'On the Function of Pit Cells, the Liver-Specific Natural Killer Cells', *Semin Liver Dis*, vol. 17, no. 04, pp. 265–286, Mar. 1997, doi: 10.1055/s-2007-1007204.
- [16] A. Kalra, E. Yetiskul, C. J. Wehrle, and F. Tuma, *Physiology, Liver*. 2024. Accessed: Feb. 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
- [17] L. Kořínková *et al.*, 'Pathophysiology of NAFLD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides', *Frontiers in Endocrinology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Nov. 26, 2020. doi: 10.3389/fendo.2020.597583.
- [18] Peter Takizawa, 'Steatosis, Histology'. Accessed: Feb. 26, 2024. [Online]. Available: [https://medcell.org/histology/digestive\\_organs\\_lab/steatosis.php](https://medcell.org/histology/digestive_organs_lab/steatosis.php)
- [19] N. R. Ahmed *et al.*, 'Comparing the Efficacy and Safety of Obeticholic Acid and Semaglutide in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review', *Cureus*, May 2022, doi: 10.7759/cureus.24829.
- [20] J. A. Del Campo, P. Gallego, and L. Grande, 'Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies', *World Journal of Hepatology*, vol. 10, no. 1. Baishideng Publishing Group Co, pp. 1–7, Jan. 27, 2018. doi: 10.4254/wjh.v10.i1.1.
- [21] Cs. Prof. RNDr. Václav Hořejší, 'Makrofágy jako pomocníci nádorů', Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: [https://www.img.cas.cz/files/2015/03/65\\_Makrofagy\\_6\\_2015.pdf](https://www.img.cas.cz/files/2015/03/65_Makrofagy_6_2015.pdf)
- [22] Z.-X. Lian and L. Li, 'The Liver as a Lymphoid Organ', in *Liver Immunology*, Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 17–33. doi: 10.1007/978-3-030-51709-0\_2.
- [23] J. Kotyza, 'PROGNOSTICKÁ HODNOTA SOLUBILNÍ INTERCELULÁRNÍ ADHEZNÍ MOLEKULY-1 (SICAM-1) V TĚLNÍCH TEKUTINÁCH ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ', 2014, Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: [https://karolinum.cz/data/clanek/1245/PLS\\_80\\_2014.37-43.pdf](https://karolinum.cz/data/clanek/1245/PLS_80_2014.37-43.pdf)

- [24] R. C. Hughes, 'Galectins', in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier, 2004, pp. 171–174. doi: 10.1016/B0-12-443710-9/00237-4.
- [25] R. J. Slack, R. Mills, and A. C. Mackinnon, 'The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease', *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 130, p. 105881, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.biocel.2020.105881.
- [26] G. Farrell *et al.*, 'Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis', *Hepatology*, vol. 69, no. 5. John Wiley and Sons Inc., pp. 2241–2257, May 01, 2019. doi: 10.1002/hep.30333.
- [27] I. C. I. Sá *et al.*, 'Soluble endoglin as a potential biomarker of nonalcoholic steatohepatitis (Nash) development, participating in aggravation of nash-related changes in mouse liver', *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 23, pp. 1–19, Dec. 2020, doi: 10.3390/ijms21239021.
- [28] Y. Liu, M. Paauwe, A. B. Nixon, and L. J. A. C. Hawinkels, 'Endoglin targeting: Lessons learned and questions that remain', *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 1. MDPI AG, pp. 1–15, Jan. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22010147.
- [29] S. Magaki, S. A. Hojat, B. Wei, A. So, and W. H. Yong, 'An introduction to the performance of immunohistochemistry', in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1897, Humana Press Inc., 2019, pp. 289–298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25.
- [30] Nordic Biosite, 'The Typical Immunohistochemistry Workflow'. Accessed: Feb. 23, 2024. [Online]. Available: <https://nordicbiosite.com/blog/the-typical-immunohistochemistry-workflow>
- [31] Z. Yin, G. Jiang, J. J. Fung, L. Lu, and S. Qian, 'ICAM-1 expressed on hepatic stellate cells plays an important role in immune regulation', *Microsurgery*, vol. 27, no. 4, pp. 328–332, Jan. 2007, doi: 10.1002/micr.20366.