

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKÝCH VIED



Kapilarizácia a jej ovplyvnenie protilátkou M1043 v pečeni myšieho modelu NASH

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Hradec Králové, 2024

Anna Romaňáková

Pod'akovanie

Týmto sa chcem pod'akovať mojej školiteľke RNDr. Ivane Němečkovej, PhD. za ochotu, čas a v neposlednom rade za odborné rady, ktoré mi s trpezlivosťou poskytovala v priebehu písania bakalárskej práce.

Ďakujem aj rodičom a blízkym za trpezlivosť a podporu.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové

11.05.2024

Anna Romaňáková

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Študijný program: Laboratorná diagnostika v zdravotníctve

Autor: Anna Romaňáková

Školiteľ: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Názov bakalárskej práce: Kapilarizácia a jej ovplyvnenie protilátkou M1043 v pečeni myšieho modelu NASH

Nealkoholická steatohepatitída (NASH) je závažnejšia forma nealkoholovej tukovej choroby pečene, ktorá súvisí s nadmernou kumuláciou tukov v pečeni. Ku kumulácií dochádza vplyvom rôznych faktorov, akými sú diabetes mellitus 2. typu, obezita a hepatitída C. Neliečená forma prispieva k aktivácii mnohých molekulárnych procesov, ktoré vedú k vzniku hepatocelulárneho karcinómu a mnohokrát to končí až transplantáciou pečene.

Cieľom našej práce bolo objasniť základné mechanizmy kapilarizácie pečenej sínusoid a aktivácie pečenej hviezdicovej buniek, ktoré sa podieľajú na vzniku fibrózy v súvislosti s prítomnosťou NASH. K pozorovaniu sme si vybrali expresiu proteínov desminu a laminínu, ktoré zaraďujeme medzi významné ukazovatele aktivácie hviezdicových pečenej buniek. K porovnávaniu zmien v expresii proteínov sme použili pečeň myši, ktoré boli na štandardnej diéte a diéte s nedostatkom cholínu a obsahom L-aminokyselín s vysokým obsahom tuku. Imunohistochemickým farbením rezov sme znázornili zmeny, ktoré nastali v súvislosti s prítomnosťou nealkoholickej steatohepatitídy a liečbou anti-endoglinovou protilátkou M1043.

Pri hodnotení histologického obrazu pečene sme mohli pozorovať výrazné zmeny v expresii oboch sledovaných proteínov u myši na vysokotukovej diéte. K potvrdeniu kapilarizácie nám slúžila zvýšená expresia laminínu vplyvom aktivácie pečenej hviezdicovej buniek, ktorý je súčasťou bazálnej membrány pečenej sínusoidálnych buniek. Zvýšená expresia desminu nám taktiež potvrdila aktiváciu pečenej hviezdicových buniek, ktoré sú považované za hlavný zdroj fibrózy u pacientov s nealkoholickou steatohepatitídou. Nezaznamenali sme žiadne zmeny v expresii vybraných proteínov v súvislosti s podávaním protilátky M1043. Naše výsledky ukazujú, že anti-endoglinová protilátka M1043 nepreukázala výrazný efekt na priebeh rozvoja fibrózy.

Kľúčové slová: nealkoholická steatohepatitída, pečenej hviezdicové bunky, anti-endoglinová protilátka M1043, pečenej sínusoidálne endotelové bunky, vysokotuková diéta, kapilarizácia, fibróza, desmin, laminín

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Study programme: Laboratory diagnostics in health care

Author: Anna Romaňáková

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Title of the bachelor thesis: Capillarization and its influence by antibody M1043 in the liver of a mouse model of NASH

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a more severe form of non-alcoholic fatty liver disease that is related to excessive accumulation of fats in the liver. The accumulation occurs due to various factors such as type 2 diabetes mellitus, obesity and hepatitis C. The untreated form contributes to the activation of many molecular processes that lead to the development of hepatocellular carcinoma, and many times this ends up in liver transplantation.

We aimed to elucidate the underlying mechanisms of hepatic sinusoid capillarization and hepatic stellate cell activation involved in the development of fibrosis in the presence of NASH. We chose to observe the expression of desmin and laminin proteins, which we include among the important markers of hepatic stellate cell activation. To compare changes in protein expression, we used livers from mice that were on a standard diet and a choline-deficient, high-fat L-amino acid diet. By immunohistochemical staining of sections, we illustrated the changes that occurred in association with the presence of nonalcoholic steatohepatitis and treatment with the anti-endoglin antibody M1043.

When assessing the histological picture of the liver, we could observe significant changes in the expression of both evaluated proteins, in mice on a high-fat diet. To confirm capillarization, we observed an increased expression of laminin due to activation of hepatic stellate cells, which is part of the basement membrane of hepatic sinusoidal cells. Increased expression of desmin also confirmed the activation of hepatic stellate cells, which are thought to be the main source of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. We did not observe any changes in the expression of selected proteins in association with the administration of M1043 antibody. Our results show that the anti-endoglin antibody M1043 did not show any significant effect on the fibrosis development.

Keywords: non-alcoholic steatohepatitis, hepatic stellate cells, anti-endoglin antibody M1043, hepatic sinusoidal endothelial cells, high-fat diet, capillarization, fibrosis, desmin, laminin

Obsah

1.	ZADANIE BAKALÁRSKEJ PRÁCE – CIEĽ PRÁCE	7
2.	ÚVOD.....	8
3.	TEORETICKÁ ČASŤ	9
3.1.	ANATÓMIA PEČENE	9
3.2.	FYZIOLÓGIA PEČENE	9
3.3.	HISTOLÓGIA PEČENE	11
3.4.	NEALKOHOLOVÁ TUKOVÁ CHOROBA PEČENE.....	15
3.4.1.	EPIDEMIOLOGIA NAFLD.....	16
3.4.2.	PATOFYZIOLÓGIA NAFLD.....	16
3.4.3.	HISTOPATOLÓGIA A HISTOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA NAFLD	17
3.4.4.	ŠTRUKTÚRA A UMIESTNENIE LSEC	17
3.4.5.	LSEC A HOMEOSTÁZA LIPIDOV V ZDRAVEJ PEČENI.....	17
3.4.6.	FUNKČNÉ A MORFOLOGICKÉ ZMENY LSEC PRI NASH	18
3.4.7.	KAPILARIZÁCIA LSEC PODPORUJE AKTIVÁCIU HSC.....	18
3.4.8.	FUNKCIA HSC PRI NASH.....	19
3.4.9.	LAMINÍN	19
3.4.10.	DESMIN.....	20
3.5.	ZVIERACIE MODELY PEČEŇOVÉHO POŠKODENIA TYPU NAFLD/NASH	20
3.5.1.	CDAHFD MODEL DIÉTY	21
3.6.	ENDOGLÍN.....	22
3.6.1.	ENDOGLÍN AKO PRO-FIBROGÉNNY FAKTOR.....	22
3.7.	PROTILÁTKA M1043	24
3.8.	IMUNOHISTOCHÉMIA	24
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
4.1.	LABORATÓRNE ZVIERATÁ.....	26
4.2.	IMUNOHISTOCHÉMIA PRE PROTILÁTKU LAMINÍN.....	26
4.3.	IMUNOHISTOCHÉMIA PRE PROTILÁTKU DESMIN.....	28
5.	VÝSLEDKY.....	30
5.1.	EXPRESIA DESMINU V PEČENI PO CDAHFD DIÉTE	30
5.2.	EXPRESIA LAMINÍNU V PEČENI PO CDAHFD DIÉTE	33
6.	DISKUSIA	38
7.	ZÁVER.....	40
8.	POUŽITÉ SKRATKY	41
9.	ZOZNAM OBRÁZKOV	43
10.	ZDROJE.....	44

1. ZADANIE BAKALÁRSKEJ PRÁCE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto bakalárskej práce bola imunohistochemická detekcia aktivácie pečeneňových hviezdicových buniek a následnej kapilarizácie pomocou markerov desminu a laminínu a možnosti ovplyvnenia pomocou anti-endoglinovej protilátky M1043.

2. ÚVOD

Pečeň dospelého človeka tvorí štruktúra mnohých buniek, ktorá pozostáva z väčších lalokov rozdelených na menšie laloky. Menšie laloky sú tvorené portálnymi pečeňovými povrazcami, ktoré sú obkolesené krvnými cievami. Je to ojedinelý orgán, vďaka dvojitému zásobovaniu krvou z portálnej žily a pečeňovej tepny. (1)

Pečeň zohráva v tele dôležitú úlohu pri plnení mnohých funkcií. Pomáha pri imunite, metabolizme, detoxikácii a ukladaní vitamínov. Stará sa o homeostázu cholesterolu, zrážanie krvi, metabolizmus liekov, ale i syntézu bielkovín. (2) Zohráva dôležitú úlohu pri metabolizme lipidov. Prijíma, tvorí a syntetizuje lipoproteíny do obehu. Pri poškodení lipidového metabolizmu dochádza k rozvoju ochorení pečene. (3)

Ak dochádza ku kumulácii lipidov bez spoločných spolupôsobiacich (užívanie alkoholu, lieky) hovoríme o nealkoholovej tukovej chorobe pečene (NAFLD). (4) Ak sa neodhalí včas vedie to až k vážnejšiemu poškodeniu pečene, k cirhóze. Cirhóze predchádza dlhé obdobie zápalov, čo vedie k nahradeniu pečeňového parenchýmu za fibrotické tkanivo, v dôsledku čoho vzniká portálna hypertenzia. (5)

NAFLD patrí medzi jedno z hlavných príčin úmrtí vo svete. Prispieva k tomu taktiež určitá miera obezity, genetické a sociálne faktory. (6)

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. ANATÓMIA PEČENE

Pečeň je uložená pod pravou bráničnou klenbou a váži približne 1,5 kg. Je pokrytá pobrušnicou (seróza) s výnimkou oblasti area nuda. Seróza je prostredníctvom subserózy pripojená k tunike fibróze, pevnému obalu nazývanému capsula Glissoni. Svojím koncom zasahuje do mediálnej časti bránice (facies diaphragmatica – časť pečene priložená k bránici) a dolnou časťou nalieha na brušné orgány (facies visceralis). Na prednej strane pečene je ostré oddelenie plôch (margo inferior), zatiaľ čo na zadnej strane plynulo prechádzajú facies diaphragmatica do facies visceralis. (7)

Z anatomického hľadiska má pečeň štyri laloky: pravý (lobus dexter), ľavý (lobus sinister), chvostový (lobus caudatus) a štvorboký (lobus quadratus). Medzi pravým a ľavým lalokom nachádzame falciformný väz. Na mediálnej strane je chvostový lalok ohraničený ligamentum venosum (Arantiov väz). Tento väz je pozostatkom embryonálneho ductus venosus, ktorý umožňuje rýchlejšie prechádzať okysličenej krvi z placenty do telového obehu plodu. (8)

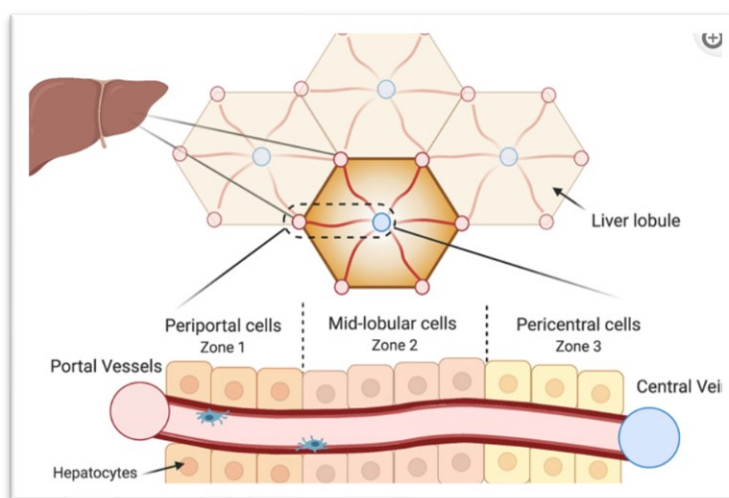
3.2. FYZIOLOGIA PEČENE

Pečeň zohráva kľúčovú úlohu v mnohých fyziologických procesoch, vrátane metabolizmu makroživín, regulácie objemu krvi, posilňovania imunitného systému, udržiavania homeostázy lipidov a odbúravania xenobiotík. Je hlavným miestom metabolizmu bielkovín, degradácie bielkovín na aminokyseliny a ich transformácia na močovinu. (9)

Metabolická funkcia pečene

Hepatocyty sú v pečeni usporiadané do šesťuholníkových jednotiek nazývaných laloky, ktoré pozostávajú z približne 15 vrstiev buniek usporiadaných koncentricky. Krv bohatá na kyslík, hormóny a živiny prúdi do laloku cez interlobulárnu tepnu a interlobulárnu žilu, a vedie smerom k centrálnej žile. Naopak žlč sa pohybuje z centra laloku von a oteká do periférneho portálneho žľčovodu. V každom laloku sa nachádzajú hepatocyty, ktoré sa na základe perfúzie delia na 3 zóny: (10)

1. **Vnútoraná zóna I: dostatočne zásobovaná kyslíkom:** na základe vysokej perfúzie zohráva zóna I úlohu v oxidačných procesoch (proteosyntéza, tvorba žlče, glukoneogenéza ...)
2. **Stredná zóna II:** hranica medzi vnútornou a vonkajšou vrstvou (oxidácia, redukcia)
3. **Vonkajšia zóna s najnižšou perfúziou III:** zohráva najväčšiu úlohu pri detoxikačných procesoch (detoxikácia, ketogenézia, glykolýza ...) (1)



Obrázok 1: Rozdelenie hepatocytov na základe perfúzie. Zóna s najnižšou perfúziou (Zone 3), stredná zóna (Zone 2), zóna dostatočne zásobovaná kyslíkom (Zone 1).

Prevzaté z: (10)

Najdôležitejšou úlohou pečene v oblasti metabolizmu sacharidov je udržiavanie glykémie. V anabolickej fáze tvorí glykogén a pri katabolickej fáze uvoľňuje glukózu. Po vyčerpaní všetkých zásob glykogénu nastáva glukoneogenézia, kedy je glukóza tvorená z kyseliny mliečnej pri svalovej činnosti. Pečeň pre svoju činnosť získava najviac energie z oxidácie mastných kyselín.

V pečeni prebieha syntéza lipoproteínov, cholesterolu a jeho premena na žlčové kyseliny. Degradáciou cholesterolu vznikajú žlčové kyseliny, ktoré sú potrebné pri emulgácii a vstrebávaní tukov. Žlčové kyseliny podliehajú enterohepatálnemu obehu, ktorý je dôležitý z hľadiska ich efektívneho využitia a udržania homeostázy.

Enterohepatálny obeh

1. Bunky parenchýmu pečene vylučujú soli žlčových kyselín do žlče.
2. Žlčovými cestami sa dostávajú najprv do žlčníka. Pri kontrakciách žlčníka do tenkého čreva.
3. Z tenkého čreva sú z väčšej časti soli žlčových kyselín resorbované do krvi v portálnom obehu (obeh, ktorý privádza krv obohatenú živinami do pečene, kde sú upravované a skladované).
4. Z portálneho obehú sú vychytávané späť do buniek parenchýmu. (11)

3.3. HISTOLÓGIA PEČENE

Pečeň je zložená z viacerých typov buniek vrátane hepatocytov, cholangiocytov, hviezdicových buniek, Kupfferových buniek a endotelových buniek pečeňových sínusoid. Každý typ buniek má svoju jedinečnú funkciu a reguluje funkcie pečene na rôznych úrovniach.

Typy buniek

Najväčšie zastúpenie majú **hepatocyty**, ktoré vykonávajú množstvo hlavných funkcií pečene. Medzi druhé najviac zastúpené bunky patria **cholangiocyty** (biliárne epitelové bunky).

Pečeňové hviezdicové bunky (HSC): existujú v kľudnom alebo aktivovanom stave. V kľudnom stave ukladajú vitamín A, po poškodení dochádza k ich narušeniu a aktivovaniu. Po aktivácii pomaly strácajú zásoby vitamínu A. Hviezdicové bunky sú zodpovedné za ukladanie kolagénu v poškodenej pečeni a prispievajú k zjazveniu pečene, ktoré prechádza až do pečeňovej cirhózy.

Kupfferove bunky sú makrofágy pečene. Ich úlohou je rozoznávať patogény a zohrávať pre alebo protizápalovú úlohu.

Pečeňové sinusoidálne pečeňové bunky (LSEC) sú zodpovedné za výmenu častíc medzi plazmou a bunkami pečene. Zohrávajú funkciu bariéry. (9)

Obal pečene

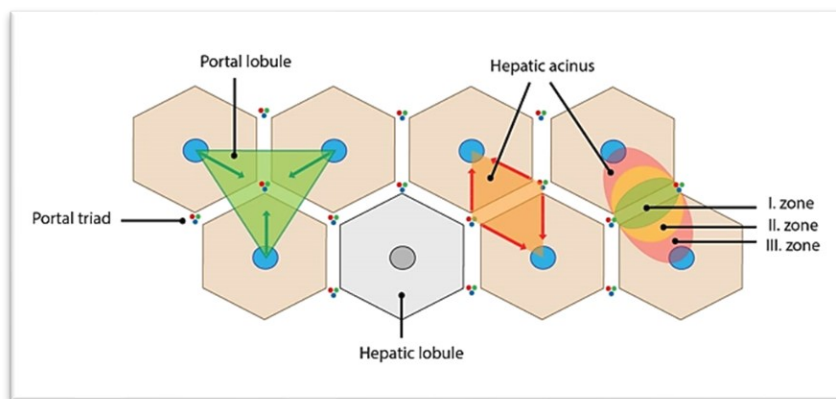
Na povrchu pečene sa nachádza pobrušnica (tunica serosa). Pod pobrušnicou je množstvo subserózy (tela subserosa) a väzivové puzdro (capsula Glissoni). Väzivové puzdro silnie v oblasti bránky (hilus). Oblasť bránky je miestom, kde do pečene vstupujú vena portae, arteria hepatica propria a vystupujú ductus hepaticus dexter et sinister a lymfatické cievy. (12)

Funkčné usporiadanie parenchýmu pečene

Stavebnou zložkou pečene je pečeneňová bunka, hepatocyt. Hepatocyt má jedno jadro uložené centricky, ale vyskytuje sa aj ako dvoj a trojjadrový. Hepatocyty sú navzájom prepletené sínusoidnými kapilármi a usporiadané do trámecov (trámčitý epitel). Usporiadané sú okolo centrálnej žily (vena centralis). Spolu vytvárajú základnú jednotku pečene – **lalôčik (acinus) centrálnej vény** (obrázok 2,3). (12)

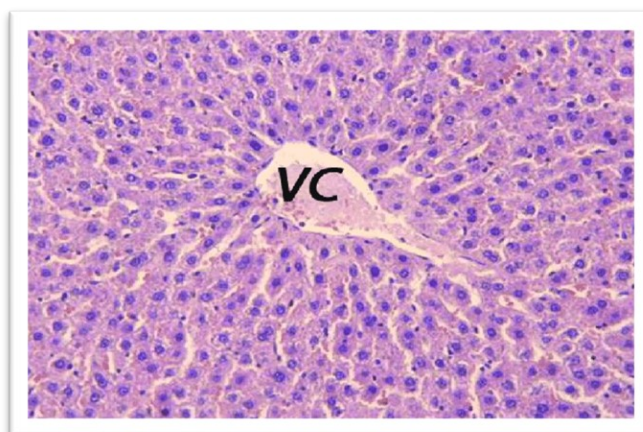
Okrem lalôčku centrálnej vény rozoznávame aj **lalôčik portálny** (obrázok 2). Je to časť parenchýmu tvaru trojuholníka, zásobovaná jednou interlobulárnou vénou a jednou interlobulárnou artériou. V jeho strede sa nachádza portobiliárny priestor a hrany tvorí centrálna vena. (obrázok 2) V pečeneňovom parenchýme rozoznávame aj **pečeneňový acinus** (obrázok 2). Je tvorený z dvoch trojuholníkových výsekov, dvoch susedných acinov. (13)

Lalôčky sa nachádzajú vo veľmi tesnej blízkosti vedľa seba a je náročné nájsť ich hranice. V niektorých častiach sú lalôčky ohraničené väzivom – ktoré je výraznejšie v oblasti portobiliárneho priestoru s portálnymi triádami. Portálnu triádu tvorí interlobulárna vena (vetva vena portae), interlobulárna artéria (vetva arteria hepatica propria), interlobulárny žľčovod a lymfatické cievy. (14)



Obrázok 2: Stavba pečenevého parenchýmu znázorňujúca lalôčik centrálnej vény („hepatic lobule“), lalôčik portálny („portal lobule“) a pečenevý acinus („hepatic acinus“).

Prevzaté z: (15)



Obrázok 3: Vena centralis (CV) s vybiehajúcimi sínusoidami.

Prevzaté z: (16)

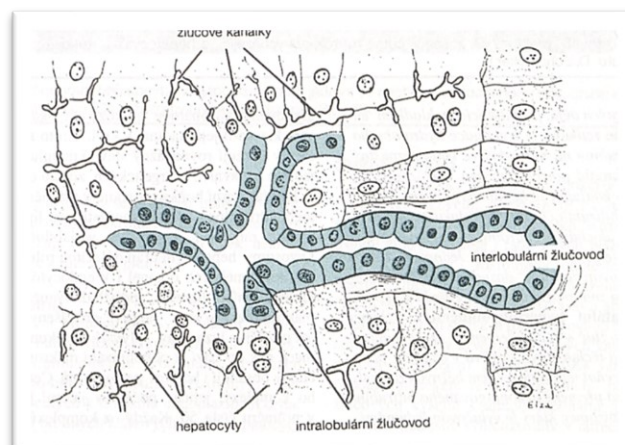
Hepatocyty

Hepatocyty sú mnohostenného tvaru. Pri farbení hematoxylínom – eozínom (HE) je ich cytoplazma eozinofílne z dôvodu veľkého množstva mitochondrií a hladkého endoplazmatického retikula. Povrch hepatocytov je v styku s endotelovými bunkami sínusoid, prostredníctvom Disseho priestoru. (14) Disseho priestor je vyplnený mikrokľmi hepatocytov, retikulárnymi vláknami a fagocytárnymi bunkami – Kupfferove bunky. Kupfferove bunky majú v cytoplazme veľké množstvo drsného endoplazmatického

retikula, veľký Golgiho aparát a početné lyzozómy. V Disseho priestore nachádzame aj bunky Itove, takzvané hviezdicové bunky, ktoré obsahujú tukové kvapôčky. (13)

Hepatocyty sú vo vzájomnom styku aj medzi sebou. V mieste styku dvoch susedných hepatocytov vzniká tubulárny priestor – žľčovú kanálik (obrázok 4). Kanálky sú ohraničené priliehajúcimi hepatocytmi, ktoré sú v tesných spojoch (zonulae occludentes). Zároveň sú hepatocyty spojené prostredníctvom spojov nexov. Žlč týmito kanálikami tečie v opačnom smere ako krv, a to z lalôčku do periférie. (14) Tieto kanálky sa napojujú prostredníctvom Herringových kanálikov na interlobulárne žľčovody, ktoré sú súčasťou portobiliárneho priestoru.

Interlobulárne žľčovody sú vystlané jednovrstvným kubickým epitelom (obrázok 4). Tie postupne splývajú v pravý a ľavý ductus hepaticus, ktoré opúšťajú pečeň v mieste hilu. Vývody sú vystlané jednovrstvným cylindrickým epitelom. (13)



Obrázok 4: Žľčové kanálky ohraničené hepatocytmi.

Prevzaté z: (14)

Funkcie hepatocytov

Funkcie hepatocytov sú exokrinné a endokrinné. Syntetizujú proteíny pre svoju potrebu, ale i pre export. Produkujú krvné bielkoviny – albumín, prothrombin, fibrinogen, transferin. Proteíny sú uvoľňované kontinuálne do krvného obehu.

Sekrécia žlče z pečene prebieha prostredníctvom žľčovodov. Žlč je zložená z vody, žľčových kyselín, fosfolipidov, cholesterolu a bilirubínu. Väčšina žľčových kyselín prechádza enterohepatálnym obehom a sú reabsorbované v čreve

a transportované späť k hepatocytom. Bilirubín vzniká rozštiepením porfyrínového jadra hemoglobínu. Rozštiepenie prebieha v monocytomakrofágovom systéme. Po následnom transporte bilirubínu do hepatocytov, prebieha v ER konjugácia s kyselinou glukuronovou, čo napomáha vylúčeniu do žlčových kanálikov.

V hepatocytoch dochádza k tvorbe niektorých metabolitov, ku glukoneogéze, tvorbe ale i štiepeniu glykogénu. Sú miestom deaminácie aminokyselín, kde výsledným produktom je urea. (13)

Krvné cievy pečene

Krv je do pečene väčšinou privádzaná prostredníctvom vena portae. Je to krv bohatá na živiny a s obsahom malého množstva kyslíka. Vena portae vstupuje do pečene cez hilus a postupne sa vetví na venae interlobulares, ktoré prebiehajú v portobiliárných priestoroch rovnobežne s dlhou osou lalôčkov centrálnej vény. Z interlobulárnych vén vychádzajú vetvy, ktoré sú uložené na okraji pečene ako venae circumlobulares. Z nich odstupujú venae praecapillares, ktoré ústia do pečenejších sínusoid. Sínusoidy sa nakoniec vlievajú do centrálnej vény (vena centralis). Centrálna vena ústí do vén sublobulárnych a pečenejších, ktoré vedú krv do vena cava inferior.

Nutritívny obeh zabezpečuje arteria hepatica propria, ktorá sa vetví dvoma spôsobmi. A. hepatica propria sa vetví na a. interlobularis, ktorá niekedy ústí priamo do pečenejších sínusoid. Vo väčšine prípadov sa vlieva do v. circumlobularis alebo v. praecapillaris. (13)

3.4. NEALKOHOLOVÁ TUKOVÁ CHOROBA PEČENE

NAFLD je jedno z najčastejších ochorení pečene na svete a s narastajúcou obezitou súčasne narastá počet prípadov. Farmakologická liečba NAFLD stále nie je dostupná, pretože toto ochorenie je komplexné a príslušné mechanizmy nie sú úplne pochopené. Okrem toho chýbajú presné a ekonomicky dostupné diagnostické metódy, čo komplikuje diagnostiku a sledovanie tohto stavu. Toto ochorenie je jedno z hlavných faktorov, ktoré prispievajú k vzniku hepatocelulárneho karcinómu (HCC) a k potrebe transplantácie pečene.

NAFLD zahŕňa rôzne stavy, ako je jednoduchá steatóza a závažnejšia forma tohto ochorenia, nealkoholická steatohepatitída, ktorá zahŕňa okrem steatózy aj zápal a poškodenie buniek pečene. (17) Je úzko spojená s faktormi ako obezita, inzulínová rezistencia a/alebo diabetes 2. typu, spolu s ďalšími metabolickými odchýlkami, ktoré sa zhrňujú pod pojem metabolický syndróm. (18)

3.4.1. EPIDEMIOLOGIA NAFLD

Výskyt NAFLD strmo stúpa, hlavne v západných krajinách. Zdá sa, že k tomuto nárastu prispievajú faktory ako nárast úrovne obezity, zvýšený výskyt obezity u detí, sedavý životný štýl, konzumácia nezdravých jedál rýchleho občerstvenia a zvyšujúci sa vek obyvateľstva. Prevalencia NAFLD je však pravdepodobne podhodnotená, pretože na detekciu ochorenia sa často využíva ultrasonografia, ktorá nemusí byť dostatočne citlivá.

NAFLD sa vyskytuje z 80 % - 90 % u obéznych dospelých, 30 % - 50 % u pacientov s diabetes mellitus, viac ako 90 % u pacientov s vysokou hladinou cholesterolu, 3 % - 10 % u detí a dokonca 40 % - 70 % u detí s nadváhou. (19)

3.4.2. PATOFYZIOLOGIA NAFLD

Na základe rôznych výskumov, ktoré skúmali patofyziológiu NAFLD a NASH sa predpokladá, že vývoj NASH je dvojstupňový proces. Proces začína ukladaním tukov v pečeni, čo vedie k zvýšeniu rezistencie voči inzulínu. Následne dochádza k bunkovým a molekulárnym zmenám, ktoré zahŕňajú oxidačný stres a oxidáciu mastných kyselín v pečeni. Tieto zmeny sú výsledkom rôznych faktorov, ako je poškodenie cytokínmi, nadmerná hladina inzulínu, oxidačné procesy železa alebo lipidov v pečeni, porucha rovnováhy ale i zmeny v imunitnom systéme.

NAFLD je možné rozdeliť do dvoch typov. **Prvý typ NAFLD** je spojený s metabolickým syndrómom a v súčasnosti sa považuje inzulínová rezistencia za hlavný patofyziologický mechanizmus. **Druhý typ NAFLD** je spojený s infekčnými ochoreniami, ktoré môžu spôsobiť infiltráciu tukov do pečene. Tento druh NAFLD môže byť spôsobený infekciami ako hepatitída C, vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV). Môže byť ale spôsobený aj užívaním určitých liekov (parenterálna výživa, glukokortikoidy, tetracyklíny a iné). (20)

3.4.3. HISTOPATOLÓGIA A HISTOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA NAFLD

Väčšinu histologických znakov NAFLD nie je možné jasne odlíšiť od znakov poškodenia pečene indukovaného alkoholom. Preto sa patológ musí spoliehať na informácie od klinického lekára. Patológovia klasifikujú NAFLD do dvoch hlavných kategórií: NAFL (makrovesikulárna steatóza s nešpecifickým zápalom ale aj bez zápalu) a NASH, ktorá zahŕňa makrovesikulárnu steatózu, balónovitú degradáciu hepatocytov, rozptýlený zápal, apoptické telieska. Včasná NASH má charakteristické histologické zmeny v acinárnej zóne 3 (zóna s najnižšou perfúziou), ale s progresiou ochorenia sa steatóza môže rovnomerne rozšíriť po celom acine pečene alebo sa môže rozložiť nepravidelne. Steatóza je histologickým znakom, ktorý je prítomný v rôznych formách NAFLD a ide o bežnú léziu, ktorá sa môže vyskytovať pri rôznych ochoreniach pečene. Steatóza by sa mala považovať za klinicky významnú, ak aspoň 5 % hepatocytov obsahuje tuk. Prejavuje sa väčšinou formou makrovesikulárnej steatózy, avšak môže byť aj zmiešaná (obsahuje malé aj veľké vakuoly).

LSEC vykazujú protizápalové vlastnosti, ktoré sú spojené so zamedzením aktivácie Kupfferových buniek a pečeneových hviezdicových buniek. V štádiu NASH dochádza k zmenám LSEC, ktoré uvoľňujú zápalové mediátory a prispievajú k množeniu zápalových buniek, čo podporuje poškodenie pečene a vznik zápalu. (21)

3.4.4. ŠTRUKTÚRA A UMIESTNENIE LSEC

LSEC predstavujú hlavnú zložku pečeneového endotelu, ktorý sa nachádza na hranici medzi krvným zásobením z viscerálneho tukového tkaniva a čreva na jednej strane a pečeneovými hviezdicovými bunkami a hepatocytmi na druhej strane. LSEC tvoria v pečeni priepustnú bariéru. Z hľadiska ich štruktúry, ktorá zahŕňa množstvo fenestrácií a chýbajúcu bazálnu membránu sú LSEC najpriepustnejšími bunkami v tele cicavcov. (22)

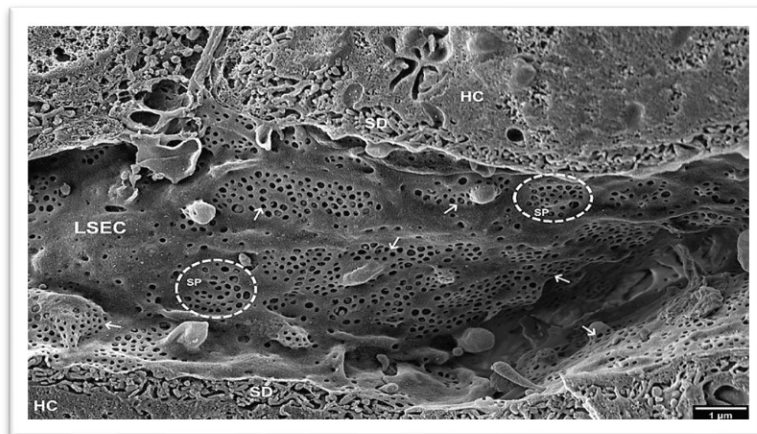
3.4.5. LSEC A HOMEOSTÁZA LIPIDOV V ZDRAVEJ PEČENI

Lipidy z potravy, ktoré cirkulujú v krvi, musia prejsť cez cievy endotel, aby sa mohli spracovať v rôznych tkanivách. LSEC sú hlavnými regulátormi dvojcestnej výmeny lipidov medzi krvou a pečeneovým parenchýmom. Fenestrácie LSEC umožňujú prenos lipoproteínov zo sínusoidálnej krvi do Disseho priestoru, kde sú zachytávané

hepatocytmi. Tieto fenestrácie tvoria selektívnu bariéru pre lipidy, pričom väčšie lipoproteíny zostávajú v lumene sínusoidy. (18)

3.4.6. FUNKČNÉ A MORFOLOGICKÉ ZMENY LSEC PRI NASH

Jednou z výrazných fenotypových zmien LSEC buniek je **strata fenestrácií** (obrázok 5), známa ako defenestrácia alebo **sínusoidálna kapilarizácia**, ktorá je spojená s **vytvorením bazálnej membrány** LSEC. Nezávislé štúdie dokázali, že defenestrácia sa objavuje už v rannom štádiu NAFLD, u myší počas 1 týždňa po zavedení diéty. Príčiny kapilarizácie nie sú úplne objasnené, ale štúdie ukázali, že permeabilita LSEC a počet fenestrácií sú nepriamo úmerné príjmu tukov v strave. (18) Kapilarizácia podporuje rozvoj steatózy tým, že bráni uvoľňovaniu lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou z hepatocytov do sínusoidálnej dutiny. To spôsobuje zadržiavanie cholesterolu a triacylglycerolov (TAG) v pečeni. (23)



Obrázok 5: Snímka pečňových sínusoid myši vo veku 4 mesiacov. Na obrázku sú prítomné pečňové sínusoidálne endotelové bunky (LSEC), fenestrácie (šípky), sieťové platničky (SP), Disseho priestor (SD) a hepatocyty (HC).

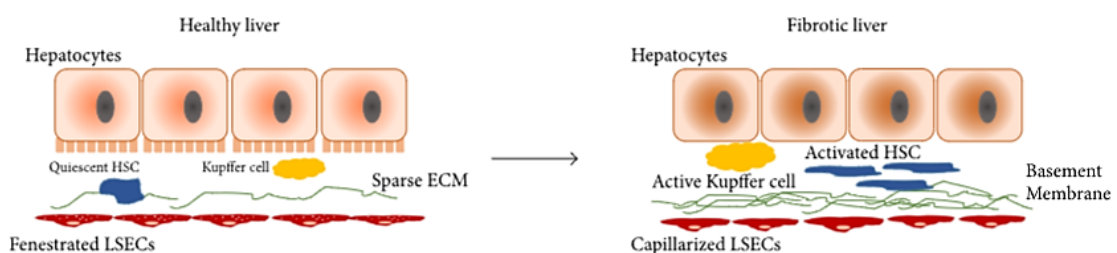
Prevzaté z : (24)

3.4.7. KAPILARIZÁCIA LSEC PODPORUJE AKTIVÁCIU HSC

Pri fibróze sporej s NASH majú LSEC dôležitú úlohu. Zdravé LSEC zabezpečujú kontrolu nad fibrózou tým, že udržiavajú pečňové hviezdicové bunky v neaktivovanom stave prostredníctvom signálnych molekúl, ako je oxid dusnatý (NO). Avšak zmenené LSEC, ktoré prešli procesom kapilarizácie a stratili svoju funkciu,

strácajú schopnosť regulovať HSC. Navyše zmenené LSEC uvoľňujú molekuly, ktoré podporujú tvorbu fibrózy, ako je TGF- β (transformujúci rastový faktor), Hedgehog molekuly, laminín a fibronektín, čo vedie k aktivácii HSC (obrázok 6).

Aktivované HSC následne produkujú Hedgehog molekuly, ktoré zosilňujú ich vlastnú aktiváciu a kapilarizáciu LSEC. Aktívne HSC produkujú zvýšené množstvo extracelulárnej matrix (ECM), čo vedie k progresii fibrózy v pečeni. Tento proces zvyšuje tvorbu jaziev a komplikuje funkciu pečene, čo je charakteristické pre pokročilé štádium NASH. (25)



Obrázok 6: Aktivácia HSC prostredníctvom zmenených LSEC buniek.

Prevzaté z: (26)

3.4.8. FUNKCIA HSC PRI NASH

HSC predstavujú významný mezenchýmový typ buniek v pečeni, ktoré plnia rozmanité úlohy vo vývoji a udržiavaní pečenej homeostázy. Tieto bunky sa nachádzajú v Disseho priestore medzi LSEC a hepatocytmi. HSC fungujú ako centrálny bod sledovania, ktorý monitoruje stav pečene a reaguje na prítomnosť patogénov a poškodenie hepatocytov.

V prípade poškodenia pečene sa HSC aktivujú a prechádzajú do fenotypu myofibroblastov, čo je sprevádzané zvýšenou produkciou extracelulárnej matrix a zápalových mediátorov. Tento proces je typickým znakom chronických pečenej ochorení, vrátane NASH. (27)

3.4.9. LAMINÍN

V porovnaní s inými orgánmi obsahuje zdravá pečeň výrazne menšie množstvo extracelulárnej matrix. Základnými zložkami ECM v zdravej pečeni sú kolagén typu I,

III, IV, V a glykoproteíny ako laminín, fibronektín a iné. V prípade fibrózy pečene sa množstvo ECM dramaticky zvyšuje. Disseho priestor má typický nízky obsah proteínov ECM, čo umožňuje ľahký transport z lumenu ciev k bunkám pečene. Počas skorých štádií fibrózy prechádza Disseho priestor zmenami. Fibrilárny kolagén spolu s nadbytočným kolagénom typu IV a laminínom sa hromadia a vytvárajú silnú a kontinuálnu bazálnu membránu. (28) Laminín interaguje s receptormi na povrchu buniek a spúšťa intracelulárnu signalizáciu, ktorá následne reguluje správanie buniek a angiogézu za fyziologických a patologických podmienok. (29)

V nedávnej štúdií sa hodnotili sérové hladiny laminínu a kolagénu IV u pacientov s NAFLD a zistila sa ich súvislosť s progresiou ochorenia. V predbežnej analýze sa hodnotila schopnosť týchto biochemických markerov predpokladať prítomnosť fibrózy u pacientov s NAFLD. Markery ukázali schopnosť rozlíšiť pacientov s a bez fibrózy. Stanovenie hodnôt sérového laminínu by sa mohlo stať parametrom výberu pacientov na indikáciu fibrózy. (30)

3.4.10. DESMIN

Desmin je členom rodiny génov intermediárnych filamentov (IF), ktorá obsahuje 70 členov. Rodina IF génov predstavuje jednu z najviac mutovaných skupín v ľudskom génome. (31)

Zvýšená produkcia desminu v pečeni a tvorba intermediárnych filamentov, ktoré obsahujú desmin, sú typickými znakmi transformácie HSC na bunky s podobnosťou myofibroblastov. Tieto bunky sú bohatým zdrojom fibróznej extracelulárnej matrix v pečeni postihnutej ochorením NASH. Navyše, bunky s podobnosťou myofibroblastov, ktoré obsahujú desmin, prispievajú ku kontrakcií sínusoid, čo spôsobuje zvýšený vnútropečeňový tlak a v konečnom dôsledku portálnu hypertenziu. (32)

3.5. ZVIERACIE MODELY PEČEŇOVÉHO POŠKODENIA TYPU NAFLD/NASH

Ideálny zvierací model pre NAFLD a jeho pokročilú formu NASH, by mal reprodukovať histopatológiu a patofyziológiu, ktoré sú pozorované u ľudí s týmito ochoreniami. To znamená, že pečeňové zmeny v zvieracom modeli NASH by mali

zahŕňať steatózu, intralobulárny zápal, hepatocelulárne balónovanie a preferenčnú fibrózu v perisínusoidálnej oblasti zóny 3, ako aj náchylnosť na nádory pečene. Okrem toho by mal model zohľadňovať metabolické abnormality, ako sú obezita, inzulínová rezistencia, nalačno hyperglykémia a dyslipidémia.

Existuje niekoľko typov zvieracích modelov NAFLD/NASH, vrátane genetických modelov, nutričných modelov a modelov kombinujúcich genetické a nutričné faktory. Napriek tomu, že bolo vytvorených mnoho zvieracích modelov NAFLD/NASH, žiadny z nich úplne neodráža všetky aspekty histopatológie a patofyziológie, ktoré sú charakteristické pre ľudské ochorenie. Preto je kľúčové vybrať si vhodný zvierací model, ktorý najlepšie zodpovedá cieľom konkrétnej štúdie. (33)

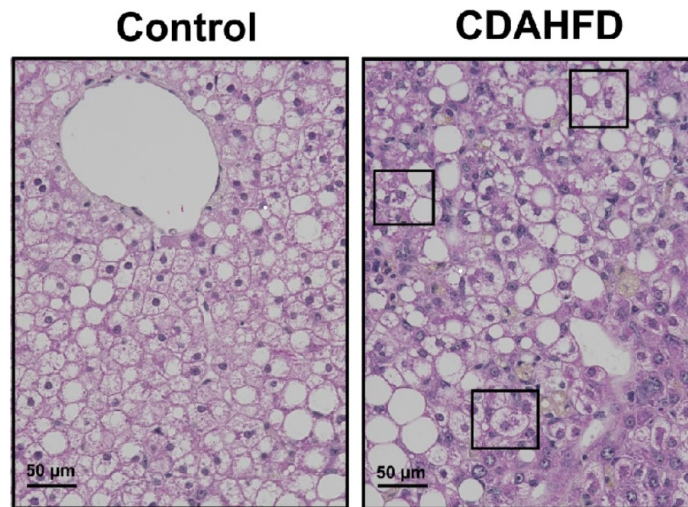
Závažnosť NASH, ktorá je indukovaná stravou, sa môže líšiť podľa druhu zvierat. Okrem toho pohlavie zohráva tiež úlohu, pričom samci sa zdajú byť citlivejší na vývoj NASH ako samice. Tento rozdiel je čiastočne spojený s účinkami estrogénu, ktorý chráni pred vývojom NASH. Nahradenie estrogénu u myší s nedostatkom estrogénu môže zlepšiť stav steatózy. (34)

3.5.1. CDAHFD MODEL DIÉTY

V porovnaní s inými modelmi, najviac využívaním modelom v štúdiách NAFLD/NASH je diéta s nedostatkom cholínu a obsahom L-aminokyselín s vysokým obsahom tuku (CDAHFD). Tento model sa považuje za verný simulátor patológie ľudskej NAFLD. Po šiestich týždňoch podávania tejto diéty vykazuje model CDAHFD steatózu pečene. Ďalšou zaujímavou vlastnosťou tohto modelu je možnosť vyvinutia steatohepatitídy u myší bez vplyvu na ich telesnú hmotnosť. CDAHFD má unikátne vlastnosti, ako je schopnosť vyvolať steatohepatitídu spolu s mitochondriálnou dysfunkciou a závažným oxidačným stresom počas jedného týždňa, ale bez fibrózy.

U myších samcov kŕmených diétou CDAHFD je pozorované závažnejšie poškodenie pečene v porovnaní so samicami, ktoré boli kŕmené rovnakou diétou. Tento rozdiel sa prejavuje väčšou akumuláciou TAG, vyššou úrovňou odumieraných hepatocytov, balónovanie hepatocytov (obrázok 7), intenzívnejším zápalom, fibrózou a dokonca aj zvýšením rizikom nádorového bujnenia, čo sú všetko znaky ľudskej NASH. U samcov myší sa prejavuje progresívny nárast telesnej hmotnosti, samice priberali

menej a vykazujú miernejšie poškodenie. Makroskopicky viditeľné nádory sa prejavujú u 25 % myší po 12 mesiacoch na tejto diéte a u 50 % - 70 % myší po 15 mesiacoch. (34)



Obrázok 7: Balónovanie hepatocytov u myší na diéte s vysokým obsahom tuku.

Prevzaté z: (35)

3.6. ENDOGLÍN

Endoglin je transmembránový glykoproteín, ktorého expresia sa zvyšuje pri hypoxii. Štúdie dokázali expresiu endoglinu na endotelových bunkách, makrofágoch, leukocytoch a fibroblastoch. Je súčasťou signalizačného komplexu receptora, ktorý transformuje rastový faktor (TGF)- β . Samotný endoglin nemá kinázovú aktivitu, ale v endotelových aj neendotelových bunkách mení signalizáciu vytvorením receptorového komplexu so signálnymi receptormi TGF- β . Jeho kľúčová úloha je hlavne vo vývojovej angiogenéze. (36)

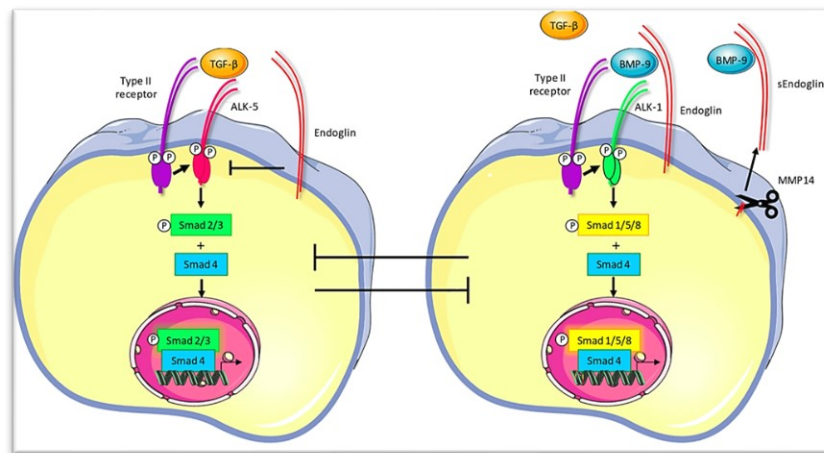
3.6.1. ENDOGLÍN AKO PRO-FIBROGÉNNY FAKTOR

Fibróza je častým príznakom mnohých chronických ochorení pečene, kde dochádza k nadmernému nahromadeniu proteínov mimo buniek, čo spôsobuje poškodenie tkaniva a postupne zlyhanie pečene. Endoglin je ko-receptor TGF- β exprimovaný najmä v endotelových bunkách, ktorý zohráva dôležitú funkciu v regulácii signálnych dráh TGF- β inhibíciou ALK5-Smad2/3 a posilnením ALK1-Smad1/5.

TGF- β je multifunkčný cytokín, ktorý ovplyvňuje mnohé aspekty buniek vrátane ich delenia, špecializácie a tvorby ECM. Zaraduje sa medzi hlavné faktory prispievajúce

k fibrotickým stavom v rôznych tkanivách. Jeho účinok je spojený so štandardnou signalizačnou dráhou, ktorá začína s dvoma typmi receptorov na povrchu buniek, označovaných ako receptor TGF- β typu I (alebo ALK-5) a receptor TGF- β typu II. Po naviazaní TGF- β na receptor typu II sa spúšťa reťazec, ktorý zahŕňa aktiváciu ALK5 a následnú fosforyláciu skupiny proteínov Smad2 a Smad3. Tieto fosforylované proteíny sa spoja so Smad4 a vytvoria komplex, ktorý sa presúva do jadra, kde ovplyvňuje aktivitu génov. (37) Ak je prítomný endoglin na povrchu bunky, dochádza k inhibícii tejto signálnej dráhy. V prítomnosti endoglinu, dochádza k väzbe BMP-9 alebo TGF- β na receptor typu II (obrázok 8), čo vedie k aktivácii receptorov typu I (ALK-1), ktorý fosforyluje Smad1/5/8. Tieto fosforylované proteíny regulujú gény dôležité pre angiogénezu. (36)

Angiogenéza, je proces tvorby nových krvných ciev z už existujúcich ciev. Tento dej sa odohráva počas rastu a obnovy tkanív po ich poškodení. Proces je riadený rôznymi rastovými faktormi a je indukovaný nedostatočným zásobením tkanív kyslíkom, tzv. hypoxiou. Je nevyhnutná pre normálny rast a regeneráciu tkanív, ale v niektorých prípadoch dochádza k jej nadmernému rozvoju, čo vedie k patologickým stavom. Zohráva dôležitú úlohu v patogeneze zápalových, fibroproliferatívnych a ischemických ochorení. (38)



Obrázok 8: *Ovplyvnenie signalizačnej dráhy v prítomnosti endoglinu.*

Prevzaté z: (36)

3.7. PROTILÁTKA M1043

Endoglin bol preskúmaný ako terapeutický cieľ pri liečbe nádorov. Hoci boli vyvinuté rôzne protilátky a peptidy zamerané na endoglin, najvýznamnejší pokrok sa dosiahol s použitím TRC105, ktorý bol tiež predmetom mnohých klinických štúdií. Protilátka TRC105 okrem svojich účinkov na imunitný systém je schopná inhibovať aj signalizáciu BMP-9, ktorá je závislá na endogline. Ukázali sa jasné protinádorové účinky na syngenických myšacích modeloch, ale väzbová afinita protilátky TRC105 k myšiemu endoglinu je nižšia ako k endoglinu ľudskému. Na lepšie pochopenie vplyvu endoglinu na signalizáciu BMP-9 boli vyvinuté ďalšie špecifické protilátky, ako napríklad M1043, ktorá je zameraná na myšie endoglin.

Protilátka M1043 účinne potláča fosforyláciu Smad1, ktorá je spúšťaná väzbou BMP-9 na receptor typu II, pričom neovplyvňujú fosforyláciu Smad2/3 indukovanú prostredníctvom väzby TGF- β na receptor typu II. Obe protilátky (M1043 i TRC105) účinne potláčajú fosforyláciu Smad1, pričom neovplyvňujú fosforyláciu Smad 2/3. (36)

3.8. IMUNOHISTOCHÉMIA

Imunohistochemia (IHC) je často využívaná diagnostická metóda na identifikáciu buniek pomocou protilátok zameraných na špecifické antigény v tkanivách. Táto metóda je vykonávaná na vzorkách, ktoré boli formalínom zafixované a následne zaliate do parafínu. Tieto vzorky majú výhodu dlhodobej stability, čo umožňuje ľahko ich skladovať. Metóda môže byť použitá na zmrazené vzorky, ale i na tkanivá zaliate do plastu. Pred IHC metódou je nutné previesť odparafínovanie a následne zavodenie vzorku.

Proces IHC sa skladá z niekoľkých krokov, ktoré zabezpečujú správnu identifikáciu cieľového antigénu. Prvým krokom je odstránenie maskovaných antigénov (AR – antigen retrieval), čo zahŕňa úpravu tkaniva pre odhalenie antigénnych epitopov a ich zviditeľnenie pre viazanie protilátok. Medzi najbežnejšie fyzikálne spôsoby pre odhalenie antigénu patrí tepelne indukované získavanie pomocou mikrovlnnej rúry, tlakového hrnca, autoklávu a vodného kúpeľa. Medzi najbežnejšie chemické spôsoby pre odhalenie antigénu patrí napríklad pridávanie denaturačného činidla (močovina, kyselina mravčia) alebo detergentu (SDS, Triton X-100). Po získaní antigénu sa aplikuje primárna protilátka, ktorá je špecifická pre daný antigén. Primárna protilátka sa následne dokazuje

sekundárnou protilátkou, ktorá môže byť konjugovaná s detekčným činidlom na zviditeľnenie antigénu.

Na vizualizáciu interakcie medzi antigénom a protilátkou sa obvykle používa priama alebo nepriama metóda. Pri priamej metóde je používané označenie primárnej protilátky a priame aplikovanie na tkanivo, táto metóda vyžaduje vyššiu koncentráciu protilátky. Pri nepriamej metóde sa označuje sekundárna protilátka, ktorá môže byť označená rôznymi značkami, ako sú fluorescenčné molekuly, alebo enzýmy. Tieto enzýmy reagujú s chromogénnym substrátom (napr. 3,3'-diaminobenzidín (DAB)) a vytvárajú farebný produkt. (39)

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. LABORATÓRNE ZVIERATÁ

K experimentu boli použité myši samci kmeňa C57BL/6J. Na začiatku experimentu mali vek 10 týždňov. Po dobu 8 týždňov boli myši kŕmené diétou CDAHFD. Po štyroch týždňoch diéty boli rozdelené do 2 skupín: CDAHFD + IgG (n=8) a CDAHFD + M1043 (n=8). Zvyšné štyri týždne bol myšiam zo skupiny CDAHFD + IgG dvakrát týždenne intraperitoneálne aplikovaný potkaní IgG (10 mg/kg) a skupine CDAHFD + M1043 bola v rovnakej schéme podávaná protilátka M1043 (10 mg/kg). Kontrolná skupina myší (n=8) bola kŕmená štandardnou diétou (chow diet).

Zvieratá boli chované vo Viváriu FaF UK HK a mali voľný prístup k vode a potrave. Zvieratá boli usmrtené v hlbokoj narkóze. Z vena cava inferior bola odobratá krv a následne vybratá pečeň. Časť pečene bola fixovaná v 4% paraformaldehyde. Tkanivá boli zaliate do parafínu a rezy boli krájané na mikrotóme s hrúbkou 4,5 μm . Pre imunohistochemickú detekciu pomocou protilátky anti-laminín a protilátky anti-desmin, boli náhodne vybraté 3 preparáty zo 4 zvierat z každej skupiny.

Experimenty boli schválené Odbornou komisiou pre zabezpečenie dobrých životných podmienok pokusných zvierat v súlade so zákonom 246/1992 Sb. o ochrane zvierat pred týraním a vyhláškou 419/2012 Sb. O ochrane pokusných zvierat.

4.2. IMUNOHISTOCHÉMIA PRE PROTILÁTKU LAMINÍN

- **Odparafínovanie** (7 x 5 min.)
 - Pred vykonaním farbiaceho protokolu IHC je nevyhnutné vykonať deparafinizáciu a rehydratáciu preparátov. Ak sa parafín neodstráni úplne, môže to viesť k nežiaducemu zafarbeniu rezov.

POUŽITÉ REAGENCIE: 2 x xylén, acetón, 95% etanol, 80% etanol, 70% etanol, destilovaná voda

- **Permeabilizácia** (2 min.)
 - Na permeabilizáciu bunkovej membrány sa najčastejšie využíva Triton-X 100, ktorý zasahuje do lipidovej membrány monomérom, čo vedie k jej permeabilizácii. Obvykle sa zriedi do fosfátového tlmivého roztoku (PBS), aby sa zabezpečil dostatočný objem na inkubáciu celej vzorky. (40)

POUŽITÉ REAGENCIE: 0,1% Triton – X 100 v PBS

- **PBS** (2 min.)
 - Je netoxický roztok, často používaný v biologických laboratóriách. Jeho výhodou oproti obvyčajnej vode je schopnosť zabrániť praskaniu alebo scvrkávaniu buniek v dôsledku osmotickej nerovnováhy. (41)
- **Odhalenie cieľového antigénu** (var – 20 min.)
 - Tepelné spracovanie tkanív pri teplotách vyšších ako 95 °C vo vhodných tlmivých roztokoch (v našom prípade citrátový tlmivý roztok) môže obnoviť antigénnosť mnohých proteínov, ktoré boli počas fixácie nereaktívne. Intenzívne tepelné spracovanie obnoví pôvodnú konformáciu antigénnych epitopov. (42)

POUŽITÉ REAGENCIE: citrátový tlmivý roztok (pH = 6.0)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Vytvorenie bariéry okolo rezov prostredníctvom DAKO PEN**
- **Aplikovanie 3% H₂O₂** (5 min.)
 - Cieľom aplikácie H₂O₂ je blokovanie endogénnej peroxidázy.

POUŽITÉ REAGENCIE: 3% H₂O₂ v PBS

- **PBS** (5 min.)
- **Aplikovanie blokovacieho roztoku** (1 hod.)
 - Blokovanie v IHC slúži na zabránenie nešpecifickej väzby protilátok na tkanivo alebo FC receptory. Pred inkubáciou s primárnou protilátkou je vhodné vykonať krok blokovania, čo pomáha redukovať nešpecifické väzby. (43)

POUŽITÉ REAGENCIE: 5% mlieko (0,5 mg sušeného mlieka + 10 ml PBS)

- **Aplikovanie primárnej protilátky** (celú noc pri 4°C)

POUŽITÉ REAGENCIE: primárna protilátka **anti-Laminin (Sigma-Aldrich, L9393)**, riedenie: 1:50 (v 5% mlieku)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Aplikovanie sekundárnej protilátky** (30 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: sekundárna protilátka anti-rabbit, riedenie: 1:100 (v PBS)

- **PBS** (2 x 5 min.)

- **Aplikovanie avidín - biotínového komplexu (ABC)** (30 min.)
- Avidín je glykoproteín s vysokou afinitou k nízkomolekulárnemu vitamínu nazývanému biotín. Avidín má viacero miest viažúcich biotín a je možné ho chemicky spojiť s peroxidázou. Biotín sa ľahko viaže na protilátky. Vzhľadom na extrémnu afinitu avidínu k biotínu je ich viazanie prakticky nevratné. (44)

POUŽITÉ REAGENCIE: ABC komplex (5 ml PBS + 1 kvapka A + 1 kvapka B)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Aplikovanie DAB** (6 min.)
- DAB vytvára hnedé sfarbenie preparátu, ktoré možno vizualizovať pomocou svetelnej mikroskopie.

POUŽITÉ REAGENCIE: DAB (1 ml riediaceho roztoku + 1 kvapka chromogenu)

- **Destilovaná voda** (5 min.)
- **Hematoxylín** (45 s)
- Hematoxylín je bázické farbivo s vysokou afinitou k jadru, ktoré farbí do modrofialova. Je využívaný k farbeniu kyslých zložiek, pričom typickým príkladom sú bunkové jadrá. Väčšina tkanív je bezfarebná, čo robí problém pre pozorovanie pod svetelným mikroskopom. Farbením chceme vytvoriť kontrast v tkanivách a zvýrazniť štruktúry, ktoré chceme študovať.
- **Opláchnutie pod tečúcou vodou** (5 min.)
- **Dehydratácia** (5 x 3 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: acetón: xylén (9:1), acetón: xylén (1:9), 3 x čistý xylén

- **Montovanie sklíčok s Eukitom**

4.3. IMUNOHISTOCHÉMIA PRE PROTILÁTKU DESMIN

- **Odparafínovanie** (7 x 5 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: 2 x xylén, acetón, 95% etanol, 80% etanol, 70% etanol, destilovaná voda

- **Permeabilizácia** (2 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: 0,1% Triton X-100 v PBS

- **PBS** (2 min.)
- **Odhalenie cieľového antigénu** (var – 20 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: citrátový tlmivý roztok (pH = 6.0)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Vytvorenie bariéry okolo rezov prostredníctvom DAKO PEN**
- **Aplikovanie 3% H₂O₂** (5 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: 3% H₂O₂ v PBS

- **PBS** (5 min.)
- **Aplikovanie blokovacieho roztoku** (1 hod.)

POUŽITÉ REAGENCIE: 5% mlieko (0,5 mg sušeného mlieka + 10 ml PBS)

- **Aplikovanie primárnej protilátky** (celú noc pri 4°C)

POUŽITÉ REAGENCIE: primárna protilátka **anti-Desmin (In Vitrogen PA5-16705)**, riedenie: 1:50 (v 5% mlieku)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Aplikovanie sekundárnej protilátky** (30 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: sekundárna protilátka anti-rabbit, riedenie: 1:100 (v PBS)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Aplikovanie avidín – biotínového komplexu ABC** (30 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: ABC komplex (5 ml PBS + 1 kvapka A + 1 kvapka B)

- **PBS** (2 x 5 min.)
- **Aplikovanie DAB** (7 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: DAB (1 ml riediaceho roztoku + 1 kvapka chromogenu)

- **Destilovaná voda** (5 min.)
- **Hematoxylín** (45 s)
- **Dehydratácia** (5 x 3 min.)

POUŽITÉ REAGENCIE: acetón: xylén (9:1), acetón: xylén (1:9), 3 x čistý xylén

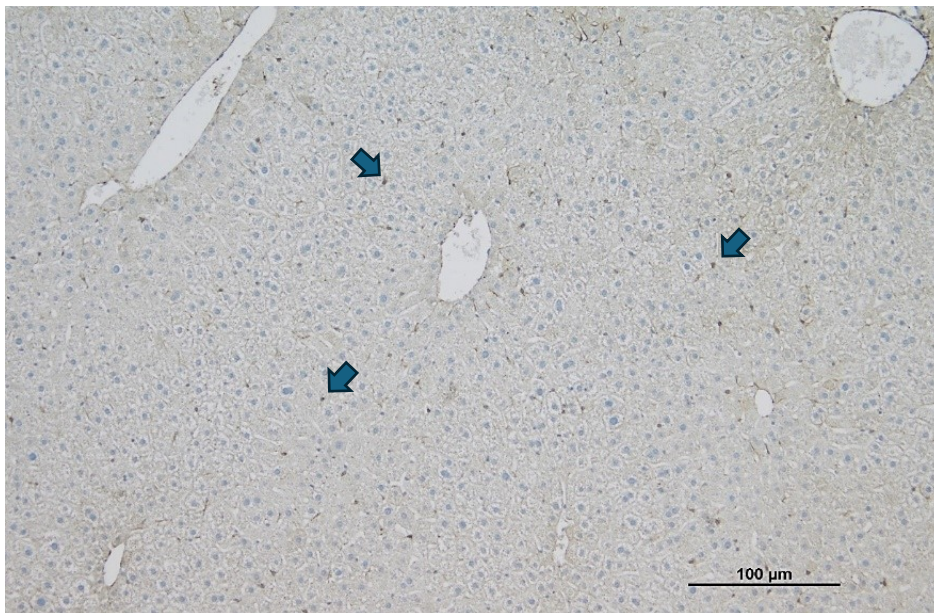
- **Montovanie sklíčok s Eukitom**

5. VÝSLEDKY

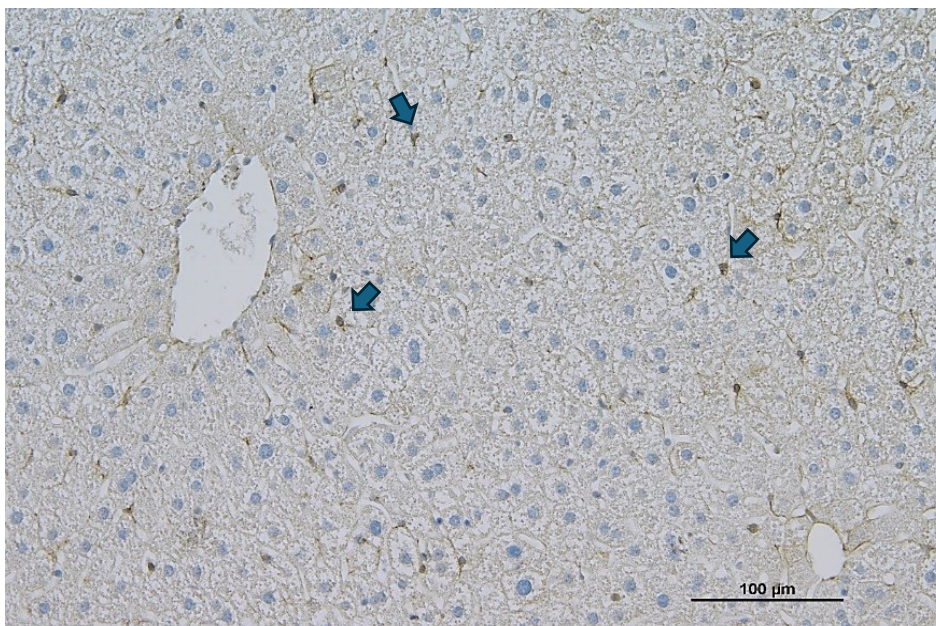
5.1. EXPRESIA DESMINU V PEČENI PO CDAHFD DIÉTE

V histologickom obraze pečene myší, ktoré boli kŕmené vysokotukovou diétou je značne vidieť znaky NASH, medzi ktoré patrí vysoká prítomnosť tuku (steatóza), balónová degradácia hepatocytov a zápalový infiltrát. V dôsledku prítomnosti lipidových vakuol (obrázok 11, biela šípka) sú jadrá hepatocytov vytláčané na okraj bunky.

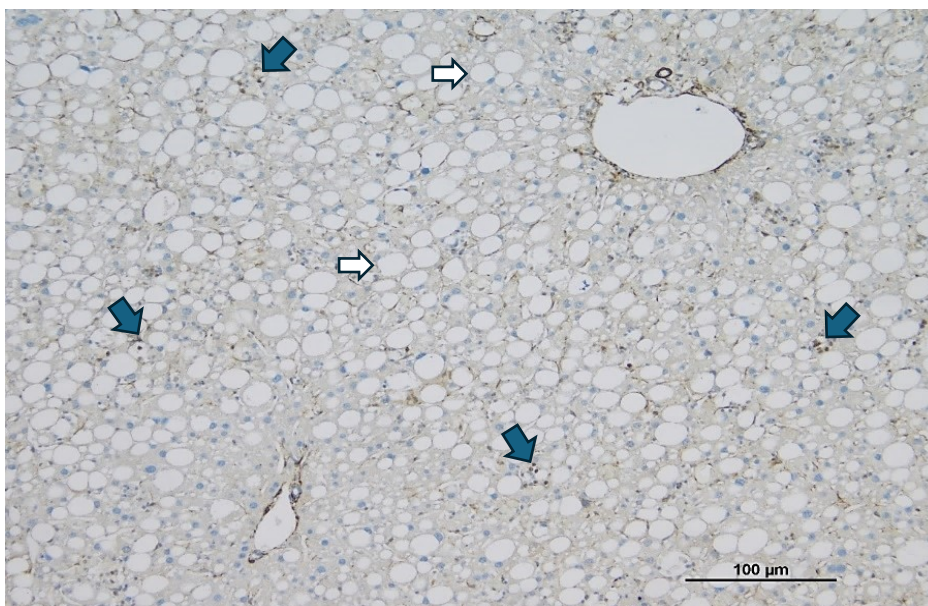
Imunohistochemickým farbením protilátkou anti-desmin sme znázornili výraznú expresiu desminu produkovaného aktivovanými HSC v dôsledku CDAHFD diéty (obrázok 11 - 14) v porovnaní s nízkou expresiou v skupine myší na štandardnej diéte. (obrázok 9, 10). Rozdiely v množstve exprimovaného desminu medzi skupinami s podávaním IgG (obrázok 11, 12) a M1043 (obrázok 13, 14) nie sú viditeľné.



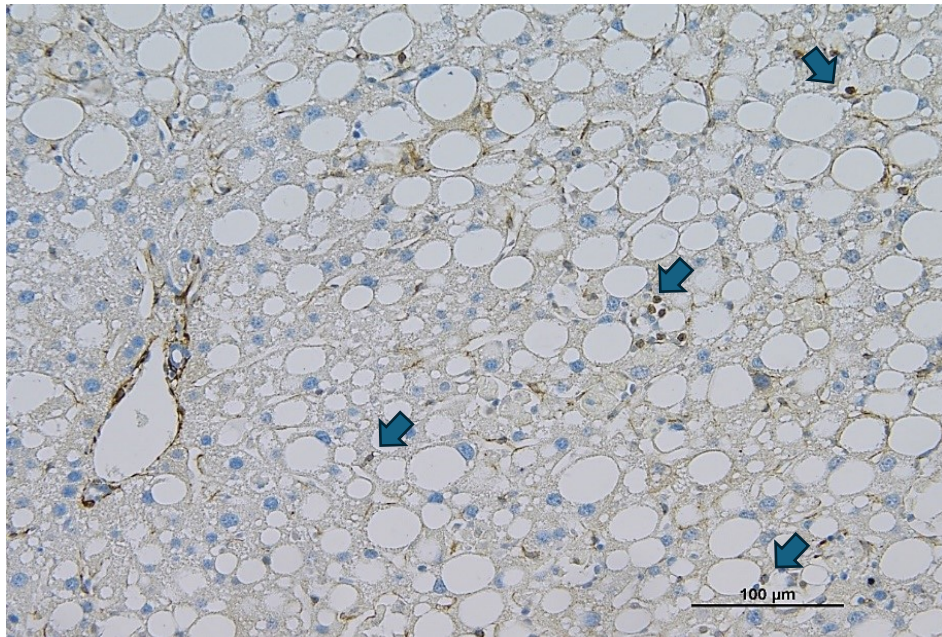
Obrázok 9: Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myší, po štandardnej diéte s nízkou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 100x.



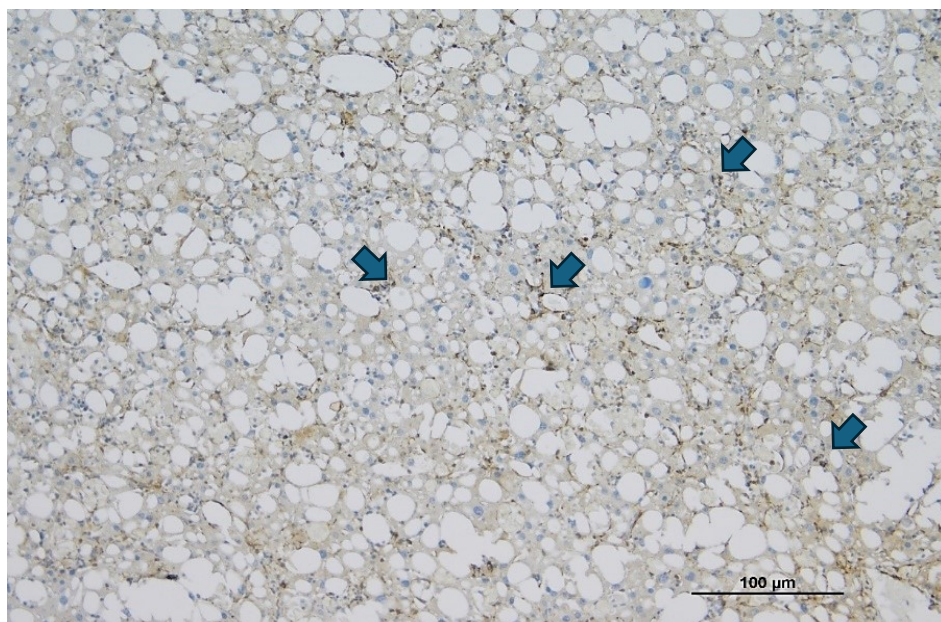
Obrázok 10: Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myši po štandardnej diéte s nízkou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 200x.



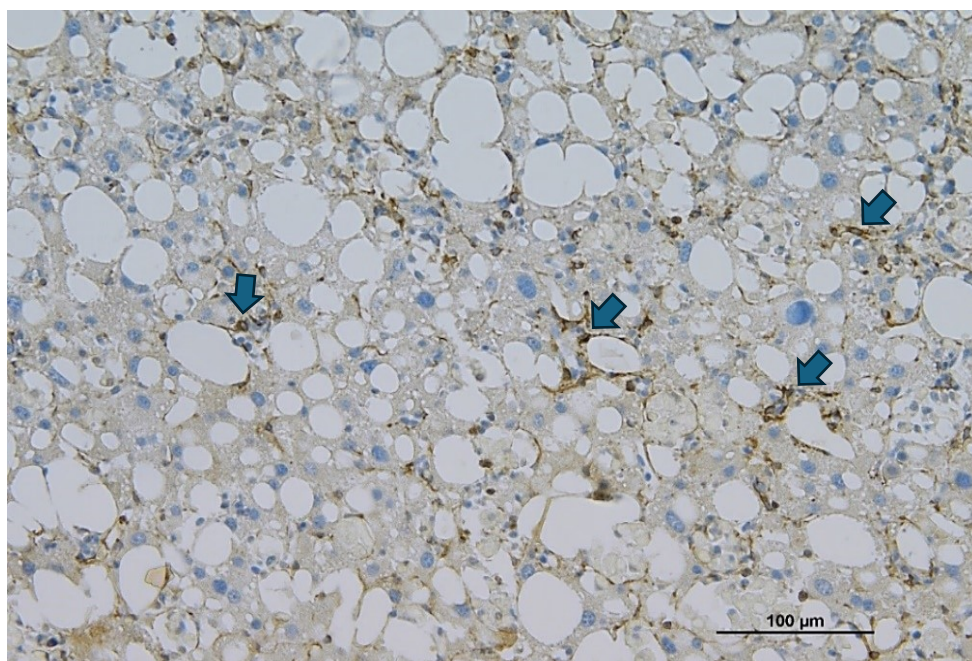
Obrázok 11: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG s výraznejšou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 100x.



Obrázok 12: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG s výraznejšou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 200x.



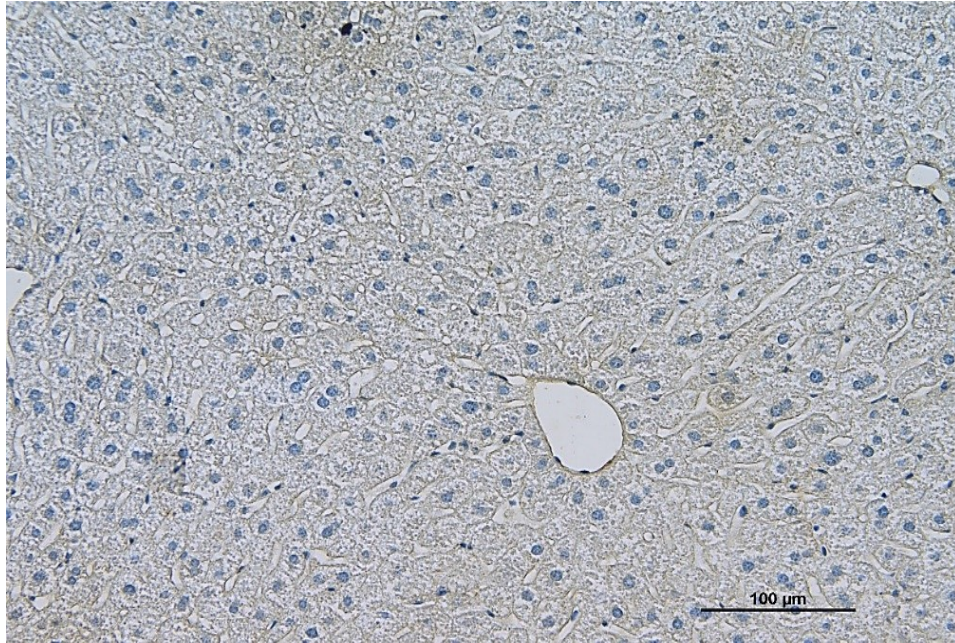
Obrázok 13: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043 s výraznejšou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 100x.



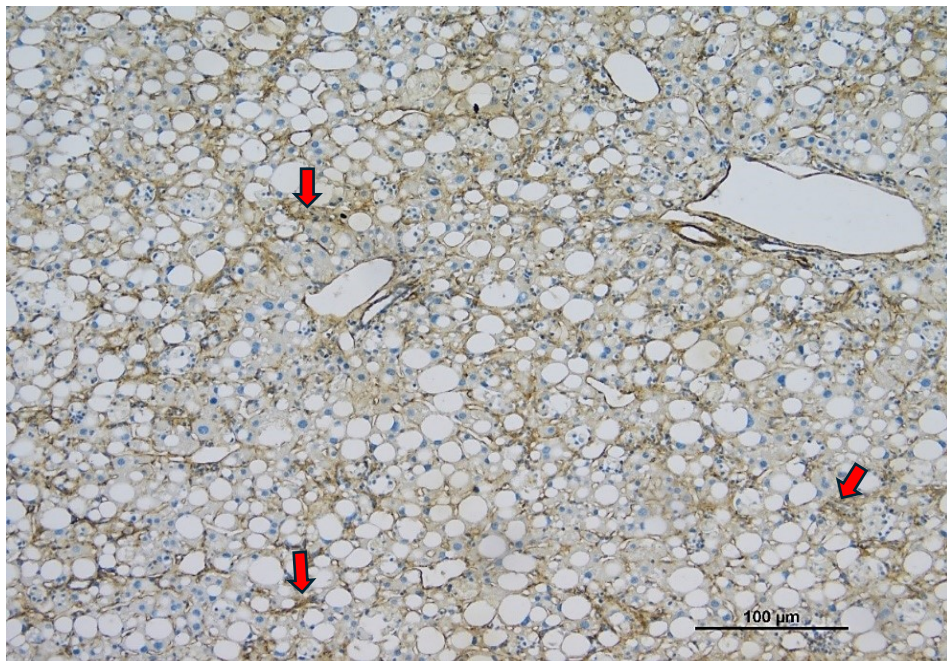
Obrázok 14: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043 s výraznejšou expresiou desminu (modrá šípka), farbenie protilátkou anti-desmin, zväčšenie 200x.

5.2. EXPRESIA LAMINÍNU V PEČENI PO CDAHFD DIÉTE

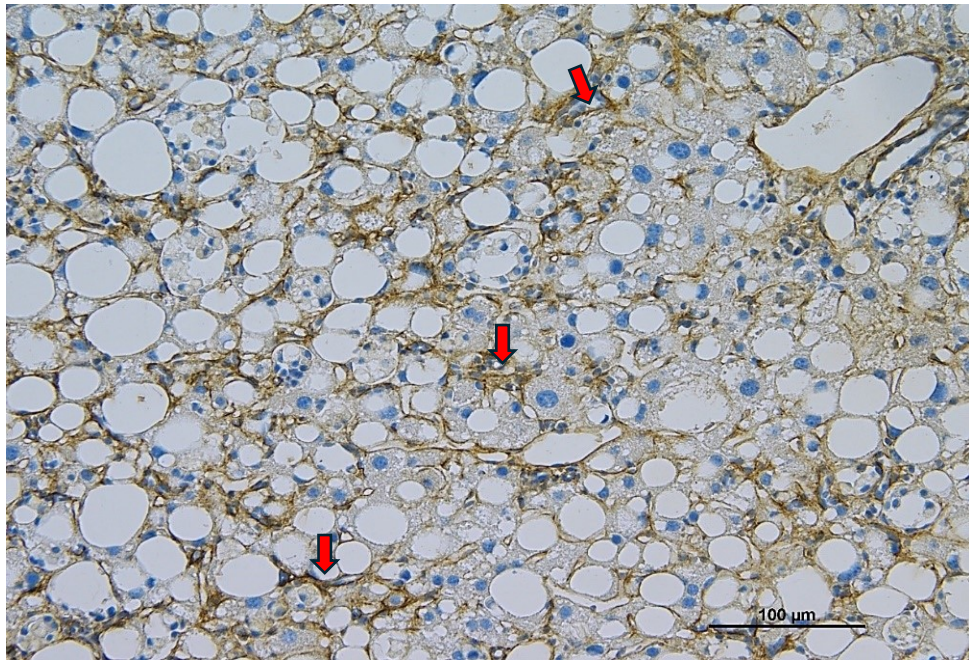
Pri porovnaní histologického obrazu skupiny, v ktorej boli myši kŕmené štandardnou diétou (obrázok 15) a skupinou, v ktorej bola myšiam podávaná diéta typu CDAHFD (obrázok 16 - 21), sme prostredníctvom imunohistochemického farbenia protilátkou anti-laminín zaznamenali rozdiely v expresii laminínu. U myši na štandardnej diéte je množstvo laminínu, ktorý je súčasťou bazálnej membrány, v porovnaní so skupinou na vysokotukovej diéte značne nižšie. Množstvo laminínu, produkovaného aktivovanými HSC, sa zvyšuje v dôsledku NASH a rozvíjajúcej sa fibrózy v pečeni myši, po CDAHFD diéte. Rozdiely medzi skupinami s aplikáciou IgG (obrázok 16 – 18) a M1043 (obrázok 19 – 21) opäť nie sú viditeľné.



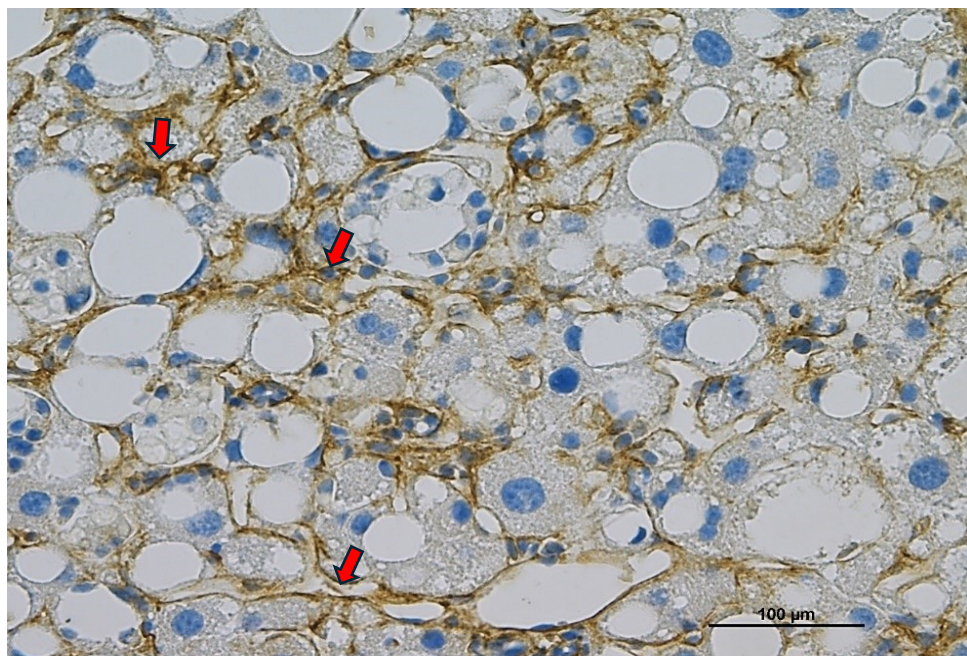
Obrázok 15: Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myši po štandardnej diéte s nízkou expresiou laminínu, farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 200x.



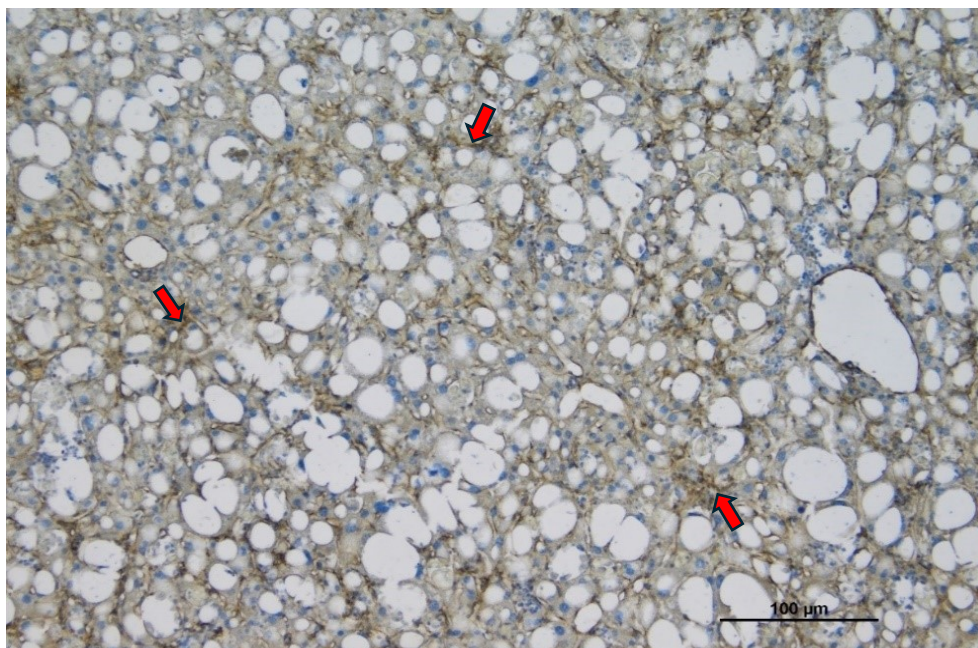
Obrázok 16: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG s výraznejšou expresiou laminínu produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 100x.



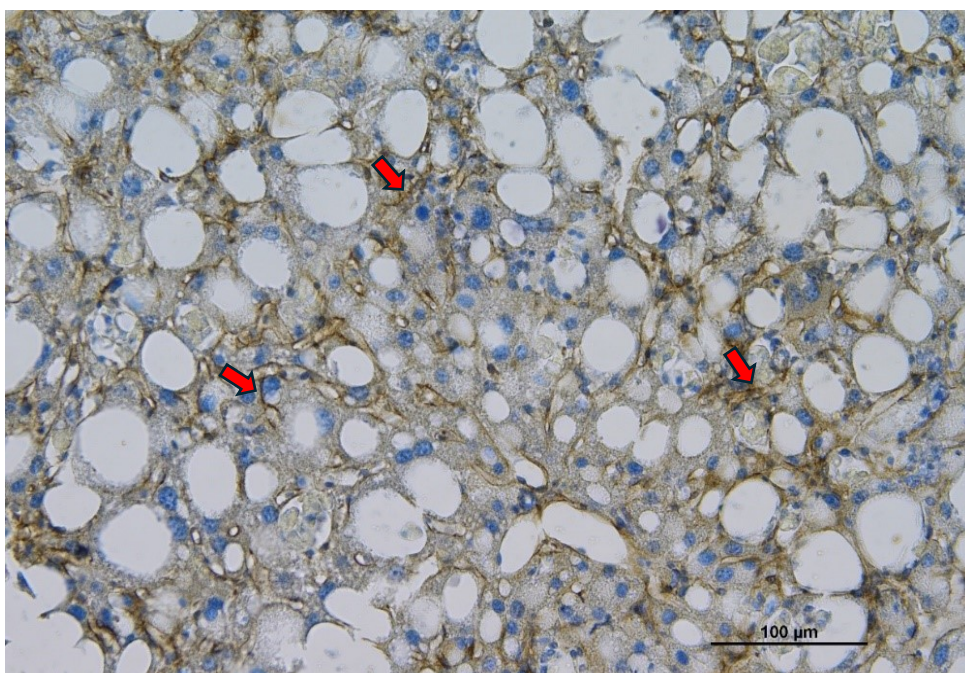
Obrázok 17: *Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG s výraznejšou expresiou laminínu produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 200x.*



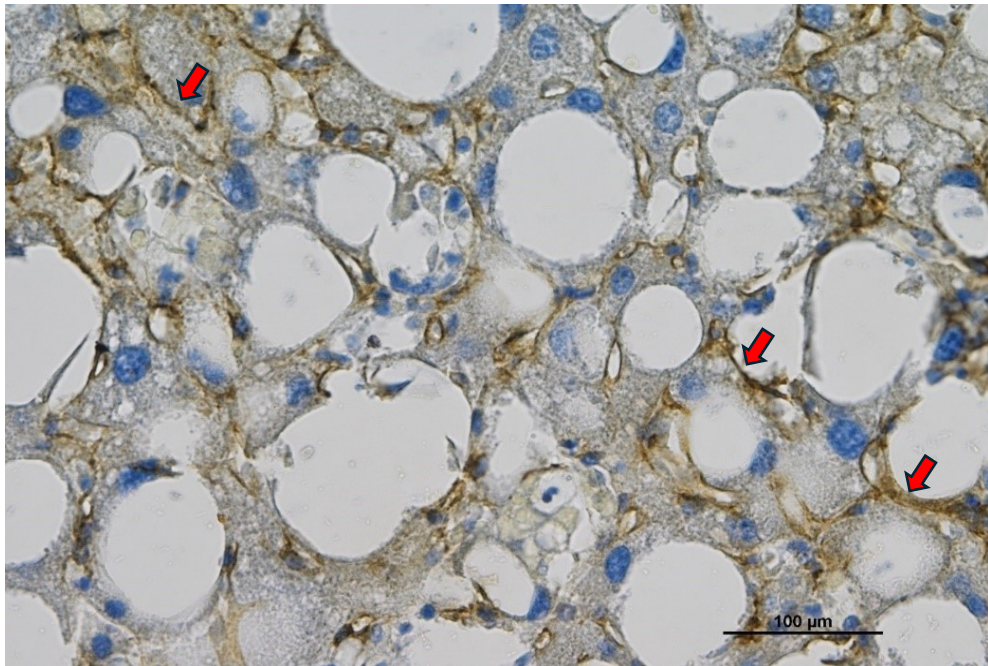
Obrázok 18: *Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG s výraznejšou expresiou laminínu, produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 400x.*



Obrázok 19: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043 s výraznejšou expresiou laminínu produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 100x.



Obrázok 20: Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043 s výraznejšou expresiou laminínu produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 200x.



Obrázok 21: *Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043 s výraznejšou expresiou laminínu produkovaného aktivovanými HSC, vytvárajúceho súvislú bazálnu membránu (červená šípka), farbenie protilátkou anti-laminín, zväčšenie 400x.*

6. DISKUSIA

Nealkoholová tuková choroba pečene (NAFLD) je definovaná ako hromadenie tuku v pečeni (steatóza pečene). Zdravá pečeň môže obsahovať určité množstvo tuku, avšak, ak toto hromadenie prekročí 5 % hepatocytov, považuje sa za patologické. NAFLD zahŕňa dva hlavné stavy: nealkoholická steatohepatitída (NASH) a makrovesikulárna steatóza (NAFL). NASH je diagnostikovaná vtedy, keď sa v pečeni s tukovou infiltráciou zistí zápalová reakcia a poškodenie hepatocytov. Diagnóza by sa nemala stanoviť u pacienta, ktorý má v anamnéze významnú konzumáciu alkoholu. NASH môže postupovať k fibróze pečene, cirhóze a dokonca k vzniku hepatocelulárneho karcinómu. Stále existuje možnosť, že NASH môže existovať spolu s inými ochoreniami pečene, ako je chronická hepatitída C. (45)

Poznanie rôznych molekulárnych procesov, ktoré sa podieľajú na rozvoji fibrózy, otvára cestu k identifikácii viacerých terapeutických cieľov vrátane cytokínov, chemokínov, signalizácie Hedgehog dráhy a ďalších cieľov na zvrátenie procesu fibrózy. Lepšie pochopenie základných mechanizmov, ktoré vedú k vzniku fibrózy, môže mať významný vplyv aj na identifikáciu neinvasívnych markerov. Zatiaľ čo rôzne zobrazovacie techniky sú schopné odlišiť prítomnosť tukovej infiltrácie (steatózu), nie sú tak presné v stanovovaní steatohepatitídy.

Pečeňové hviezdicové bunky (HSC), ktoré sú obvykle v neaktívnom stave a ukladajú vitamín A, sa počas poškodenia pečene aktivujú. Tento proces je podporovaný uvoľňovaním zápalových molekúl, ako je napríklad transformujúci rastový faktor β (TGF- β), tumor nekrotizujúci faktor α (TNF- α) a chemokíny. Aktivované HSC sa postupne transformujú na kontraktilné a fibrogénne myofibroblasty, ktoré sa vyznačujú zvýšenou expresiou proteínov desmin, α -hladký svalový aktín (α -SMA) a kolagén α 1. HSC, ktoré sú v aktivovanom stave produkujú veľké množstvo fibrilárnych kolagénov typu I a III, ale aj laminín a fibrinogén. (46)

Vzhľadom na silný záujem o objavenie bezpečných a účinných liečebných metód pre NASH sa vytvorili rôzne zvieracie modely tohto ochorenia. V súčasnosti neexistuje žiadny jednotný zvierací model, ktorý by zodpovedal všetkým ochoreniam ľudskej NASH. Preto je dôležité, aby sa pri experimente zvolili podľa špecifických aspektov, na ktoré sa dá zamerať. Avšak modely, ktoré dokážu zachytiť nielen histopatológiu pečene,

ale aj celkové metabolické dysfunkcie spojené s NASH, majú významnejšiu hodnotu. Zvolenie vhodného modelu je kľúčové pre lepšie porozumenie patogenézy NASH. (47)

V našej práci sme sa zamerali na zmeny v pečeni v súvislosti s ochorením NASH, ktoré vedú k aktivovaniu HSC buniek, ktoré následne produkujú pro-fibrogénne markery – desmin a laminín. Výsledky ukazujú, že pri hodnotení zmien v histologickom obraze pečene myši na štandardnej diéte a diéte typu CDAHFD, sme mohli pozorovať výraznejšiu expresiu oboch sledovaných proteínov u myši na CDAHFD diéte. Laminín sa vplyvom aktivácie HSC začal zvýšene exprimovať a hromadiť extracelulárne, kde vytvoril kontinuálnu bazálnu membránu LSEC ako hlavný znak endotelovej dysfunkcie a kapilarizácie. (30) Výraznejšia expresia desminu nám v zhode s ostatnými autormi taktiež potvrdila aktiváciu HSC. (32) Pri porovnávaní skupiny myši, ktorým bola injekčne podávaná protilátka IgG a protilátka M1043, sme žiadne zmeny nepozorovali. Desmin a laminín teda môžeme zaradiť medzi biomarkery, ktoré slúžia na preukázanie aktivácie HSC, ktoré sú považované za hlavný zdroj fibrózy u pacientov s NASH, avšak anti-endoglinová protilátka v nami zvolenej schéme experimentu neukázala výrazný efekt na priebeh rozvoja fibrózy. Tento výsledok je nutné potvrdiť aj inými molekulárnymi metódami. Ďalšie pokračovanie histologickej analýzy bude zamerané na fluorescenčnú mikroskopiu za využitia detekcie kolokalizácie rôznych markerov pre pozorovanie vzájomných vzťahov viacerých typov buniek, ktoré majú svoju úlohu v rozvoji NASH.

V posledných rokoch bolo navrhnutých niekoľko špecifických proteínov na diagnostiku NASH a štádia fibrózy. Štúdie naznačujú, že kombinácia viacerých sérových biomarkerov zlepšuje ich diagnostickú presnosť. Zavedenie nových technológií by mohlo viesť k identifikácii neinvazívnych biomarkerov na detekciu NAFLD, rozlíšenie NASH od NAFL a určenie štádia fibrózy. Avšak, je nevyhnutné, aby tieto nové prístupy boli overené na väčšom množstve vzoriek. (48)

7. ZÁVER

V rámci bakalárskej práce sme prostredníctvom imunohistochemických metód preukázali zvýšenú expresiu desminu a laminínu, ktoré zaraďujeme medzi hlavné ukazovatele aktivácie HSC, a zároveň sme zhodnotili efekt anti-endoglinovej protilátky M1043 na priebeh rozvoja fibrózy.

Naše výsledky poukázali na zmeny, ktoré nastali v pečeni myší, kŕmených CDAHDF diétou. U oboch sledovaných proteínov došlo k ich výraznej expresii. Laminín sa začal hromadiť extracelulárne a vytvoril súvislú bazálnu membránu LSEC. A zároveň vplyvom aktivácie HSC došlo k výraznejšej expresii desminu. Priebeh rozvoja fibrózy sme sa pokúsili ovplyvniť anti-endoglinovou protilátkou M1043. Pri porovnaní skupiny myší, ktorým bola podávaná protilátka M1043 a protilátka IgG, sme nezaznamenali výrazne zmeny. Na základe našich výsledkov sme zhodnotili, že desmin a laminín môžeme zaradiť medzi biomarkery na preukázanie aktivácie HSC, ktoré sú považované za hlavný zdroj fibrózy u pacientov s NASH.

8. POUŽITÉ SKRATKY

ABC	avidin-biotin komplex
AR	antigen retrieval (odstránenie maskovaných antigénov)
CDAHFD	the choline-deficient, l-amino acid-defined, high-fat diet (diéta s nedostatkom cholínu a obsahom L-aminokyselín s vysokým obsahom tuku)
DAB	diaminobenzidín
ECM	extracelulárna matrix
ER	endoplazmatické retikulum
HC	hepatocyty
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatocelulárny karcinóm)
HE	farbenie hematoxylín-eozín
HIV	human immunodeficiency virus (vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti)
HSC	hepatic stellate cells (pečeňové hviezdicové bunky)
IF	intermediárne filamenty
IHC	imunohistochemia
LSEC	pečeňové sínusoidálne endotelové bunky
NAFL	non-alcoholic fatty liver (makrovesikulárna steatóza)
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease (nealkoholová tuková choroba pečene)
NASH	non-alcoholic steatohepatitis (nealkoholická steatohepatitída)
NO	oxid dusnatý
PBS	fosfátom pufovaný fyziologický roztok
SD	space of Disse (Disseho priestor)
SP	sieťové platničky

TAG	triacylglyceroly
TGF-β	transforming growth factor beta (transformující rastový faktor β)
α-SMA	alpha-smooth muscle actin (α -hladký svalový aktín)

9. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Rozdelenie hepatocytov na základe perfúzie	10
Obrázok 2 Stavba pečňového parenchýmu znázorňujúca lalôčik centrálnej vény	13
Obrázok 3 Vena centralis (CV) s vybiehajúcimi sínusoidami.	13
Obrázok 4 Žlčové kanálky ohraničené hepatocytmi.....	14
Obrázok 5 Snímka pečňových sínusoid myši vo veku 4 mesiacov	18
Obrázok 6 Aktivácia HSC prostredníctvom zmenených LSEC buniek.	19
Obrázok 7 Balónovanie hepatocytov u myši na diéte s vysokým obsahom tuku.....	22
Obrázok 8 Ovplyvnenie signalizačnej dráhy v prítomnosti endoglínu.....	23
Obrázok 9 Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myši po štandardnej diéte	30
Obrázok 10 Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myši po štandardnej diéte.....	31
Obrázok 11 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG	31
Obrázok 12 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG	32
Obrázok 13 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043	32
Obrázok 14 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043	33
Obrázok 15 Reprezentatívny obrázok pečene kontrolnej skupiny myši po štandardnej diéte.....	34
Obrázok 16 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG	34
Obrázok 17 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG	35
Obrázok 18 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + IgG	35
Obrázok 19 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043	36
Obrázok 20 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043	36
Obrázok 21 Reprezentatívny obrázok pečene myši v skupine CDAHFD + M1043	37

10. ZDROJE

1. KALRA, Arjun, Ekrem YETISKUL, Chase J. WEHRLE a Faiz TUMA. *Physiology, Liver*. 2023.
2. THOMPSON, Wendy L. a Takanori TAKEBE. Human liver model systems in a dish. *Development, Growth & Differentiation* [online]. 2021, **63**(1), 47–58. Dostupné z: doi:10.1111/dgd.12708
3. ARVIND, Ashwini, Stephanie A OSGANIAN, David E COHEN a Kathleen E COREY. *Lipid and Lipoprotein Metabolism in Liver Disease*. 2000.
4. ANTUNES, Catiele, Mohammadreza AZADFARD, Gilles J. HOILAT a Mohit GUPTA. *Fatty Liver*. 2023.
5. GINÈS, Pere, Aleksander KRAG, Juan G ABRALDES, Elsa SOLÀ, Núria FABRELLAS a Patrick S KAMATH. Liver cirrhosis. *The Lancet* [online]. 2021, **398**(10308), 1359–1376. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)01374-X
6. TENG, Margaret Lp, Cheng Han NG, Daniel Q HUANG, Kai En CHAN, Darren Jh TAN, Wen Hui LIM, Ju Dong YANG, Eunice TAN a Mark D MUTHIAH. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and molecular hepatology* [online]. 2023, **29**(Suppl), S32–S42. Dostupné z: doi:10.3350/cmh.2022.0365
7. ČIHÁK, Radomír a Miloš GRIM. *Anatomie 2*. B.m.: Grada Publishing, spol. s r.o., 2002, 2002. ISBN ISBN 80-247-0143-X.
8. VERNON, Hamilton, Chase J. WEHRLE, Valentine Sampson K. ALIA a Anup KASI. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Liver. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 [vid. 2024-03-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500014/>
9. TREFTS, Elijah, Maureen GANNON a David H. WASSERMAN. The liver. *Current Biology* [online]. 2017, **27**(21), R1147–R1151. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
10. CUNNINGHAM, Rory P. a Natalie PORAT-SHLIOM. Liver Zonation – Revisiting Old Questions With New Technologies. *Frontiers in Physiology* [online]. 2021, **12**, 732929. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2021.732929
11. KITTNAR OTOMAR A KOLEKTÍV. *Lékařská fyziologie*. 2. 2020. ISBN 978-80-247-1963-4.
12. G. SÓLYA, Š. TÓTH, J. VESELÁ, a M. MAREKOVÁ. MULTIDISCIPLINÁRNÝ POHĽAD NA PEČEŇ [online]. nedatováno. Dostupné z: <https://www.mefanet.cz/res/file/mefanet2010/prispevky/solya-full.pdf>

13. *Funkční histologie* | Moravská zemská knihovna | Digitální knihovna Kramerius [online]. [vid. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://www.digitalniknihovna.cz/mzk/view/uuid:a9a30530-fb9c-11e3-9789-005056827e52?page=uuid:9dd75090-0e6f-11e4-a8ab-001018b5eb5c>
14. *Základy histologie* | Moravská zemská knihovna | Digitální knihovna Kramerius [online]. [vid. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://www.digitalniknihovna.cz/mzk/view/uuid:a03fef80-f9aa-11e6-aa6c-005056827e52?page=uuid:21ee4b80-0be9-11e7-9d16-005056825209>
15. *Normal Liver Histology 101* | AASLD [online]. 12. červen 2020 [vid. 2024-05-09]. Dostupné z: <https://www.aasld.org/liver-fellow-network/core-series/pathology-pearls/normal-liver-histology-101>
16. Fig 3. Control group: the histological appearance of liver is normal... *ResearchGate* [online]. [vid. 2024-05-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Control-group-the-histological-appearance-of-liver-is-normal-Vena-centralis-VC-H-E_fig4_255973692
17. NASSIR, Fatiha. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* [online]. 2022, **12**(6), 824–824. Dostupné z: [doi:10.3390/biom12060824](https://doi.org/10.3390/biom12060824)
18. HAMMOUTENE, Adel a Pierre-Emmanuel RAUTOU. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* [online]. 2019, **70**(6), 1278–1291. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jhep.2019.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.012)
19. DORAIRAJ, Vicneswary, Siti Aishah SULAIMAN, Nadiah ABU a Nor Azian ABDUL MURAD. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Pathogenesis and Noninvasive Diagnosis. *Biomedicines* [online]. 2021, **10**(1), 15. ISSN 2227-9059. Dostupné z: [doi:10.3390/biomedicines10010015](https://doi.org/10.3390/biomedicines10010015)
20. POUWELS, Sjaak, Nasser SAKRAN, Yitka GRAHAM, Angela LEAL, Tadeja PINTAR, Wah YANG, Radwan KASSIR, Rishi SINGHAL, Kamal MAHAWAR a Dharmanand RAMNARAIN. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *BMC Endocrine Disorders* [online]. 2022, **22**(1), 63–63. Dostupné z: [doi:10.1186/s12902-022-00980-1](https://doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1)
21. BROWN, Gregory Thomas a David E KLEINER. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: clinical and experimental* [online]. 2016, **65**(8), 1080–6. Dostupné z: [doi:10.1016/j.metabol.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.008)
22. POISSON, Johanne, Sara LEMOINNE, Chantal BOULANGER, François DURAND, Richard MOREAU, Dominique VALLA a Pierre-Emmanuel RAUTOU. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology* [online]. 2017, **66**(1), 212–227. ISSN 1600-0641. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jhep.2016.07.009](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009)

23. NASIRI-ANSARI, Narjes, Theodoros ANDROUTSAKOS, Christina-Maria FLESSA, Ioannis KYROU, Gerasimos SIASOS, Harpal S. RANDEVA, Eva KASSI a Athanasios G. PAPAVALASSILIOU. Endothelial Cell Dysfunction and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Concise Review. *Cells* [online]. 2022, **11**(16), 2511. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11162511
24. SZAFRANSKA, Karolina, Larissa D. KRUSE, Christopher Florian HOLTE, Peter MCCOURT a Bartłomiej ZAPOTOCZNY. The wHole Story About Fenestrations in LSEC. *Frontiers in Physiology* [online]. 2021, **12** [vid. 2024-05-09]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2021.735573
25. DU, Wei a Lin WANG. The Crosstalk Between Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Hepatic Microenvironment in NASH Related Liver Fibrosis. *Frontiers in Immunology* [online]. 2022, **13**, 936196. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2022.936196
26. HINDAWI. *Figure 1 | SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis* [online]. [vid. 2024-05-09]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/4097205/fig1/>
27. CARTER, James K. a Scott L. FRIEDMAN. Hepatic Stellate Cell-Immune Interactions in NASH. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2022, **13**, 867940. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2022.867940
28. NATARAJAN, Vaishaali, Edward N. HARRIS a Srivatsan KIDAMBI. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis. *BioMed Research International* [online]. 2017, **2017**, e4097205. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2017/4097205
29. SIMON-ASSMANN, Patricia, Gertraud OREND, Elmina MAMMADOVA-BACH, Caroline SPENLÉ a Olivier LEFEBVRE. Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. 2011, **55**(4–5), 455–465. ISSN 0214-6282, 1696-3547. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.103223ps
30. ROSA, Heitor a Edison Roberto PARISE. Is there a place for serum laminin determination in patients with liver disease and cancer? *World Journal of Gastroenterology : WJG* [online]. 2008, **14**(23), 3628–3632. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.14.3628
31. CLEMEN, Christoph S., Harald HERRMANN, Sergei V. STRELKOV a Rolf SCHRÖDER. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica* [online]. 2013, **125**(1), 47–75. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-012-1057-6
32. GEERTS, Albert, Camilla ELIASSON, Toshiro NIKI, Annemie WIELANT, Freja VAEYENS a Milos PEKNY. Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology* [online]. 2001, **33**(1), 177–188. ISSN 1527-3350. Dostupné z: doi:10.1053/jhep.2001.21045

33. TAKAHASHI, Yoshihisa, Yurie SOEJIMA a Toshio FUKUSATO. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [online]. 2012, **18**(19), 2300–2308. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v18.i19.2300
34. SUGASAWA, Takehito, Seiko ONO, Masato YONAMINE, Shin-ichiro FUJITA, Yuki MATSUMOTO, Kai AOKI, Takuro NAKANO, Shinsuke TAMAI, Yasuko YOSHIDA, Yasushi KAWAKAMI a Kazuhiro TAKEKOSHI. One Week of CDAHFD Induces Steatohepatitis and Mitochondrial Dysfunction with Oxidative Stress in Liver. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(11), 5851. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22115851
35. TEAM, PhoenixBio. *Targeting NASH Drug Development with a New Humanized Liver NASH Model* [online]. [vid. 2024-05-09]. Dostupné z: <https://www.phoenixbio.com/news/targeting-nash-drug-development-with-a-new-humanized-liver-nash-model>
36. LIU, Yingmiao, Madelon PAAUWE, Andrew B. NIXON a Lukas J.A.C. HAWINKELS. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **22**(1), 147. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22010147
37. FINNISON, Kenneth W. a Anie PHILIP. Endoglin in liver fibrosis. *Journal of Cell Communication and Signaling* [online]. 2012, **6**(1), 1–4. ISSN 1873-9601. Dostupné z: doi:10.1007/s12079-011-0154-y
38. ELPEK, Gülsüm Özlem. Angiogenesis and liver fibrosis. *World Journal of Hepatology* [online]. 2015, **7**(3), 377. Dostupné z: doi:10.4254/wjh.v7.i3.377
39. MAGAKI, Shino, Seyed A. HOJAT, Bowen WEI, Alexandra SO a William H. YONG. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2019, **1897**, 289–298. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25
40. An overview of permeabilization in immunocytochemistry (ICC). *Bio-Techne* [online]. [vid. 2024-04-09]. Dostupné z: <https://www.bio-techne.com/resources/blogs/an-overview-of-permeabilization-in-immunocytochemistry-icc>
41. MARTIN, N. C., A. A. PIRIE, L. V. FORD, C. L. CALLAGHAN, K. MCTURK, D. LUCY a D. G. SCRIMGER. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society* [online]. 2006, **46**(3), 179–184. ISSN 1355-0306. Dostupné z: doi:10.1016/S1355-0306(06)71591-X
42. KRENACS, Laszlo, Tibor KRENACS, Eva STELKOVICS a Mark RAFFELD. Heat-Induced Antigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2010, **588**, 103–119. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59745-324-0_14

43. *IHC Blocking* [online]. [vid. 2024-04-10]. Dostupné z: <https://www.ptglab.com/videos/immunohistochemistry/ihc-blocking/>
44. *Avidin-Biotin Complex (ABC) Methods - LabCE.com, Laboratory Continuing Education* [online]. [vid. 2024-04-10]. Dostupné z: https://www.labce.com/spg4448617_avidin_biotin_complex_abc_methods.aspx
45. SHARMA, Bashar a Savio JOHN. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024 [vid. 2024-04-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470243/>
46. SIRCANA, Antonio, Elena PASCHETTA, Francesca SABA, Federica MOLINARO a Giovanni MUSSO. Recent Insight into the Role of Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(7), 1745. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms20071745](https://doi.org/10.3390/ijms20071745)
47. *Mistakes in mouse models of nonalcoholic steatophepatitis and how to avoid them* [online]. [vid. 2024-04-20]. Dostupné z: <https://ueg.eu/a/154>
48. DI MAURO, Stefania, Alessandra SCAMPORRINO, Agnese FILIPPELLO, Antonino DI PINO, Roberto SCICALI, Roberta MALAGUARNERA, Francesco PURRELLO a Salvatore PIRO. Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(21), 11905. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms222111905](https://doi.org/10.3390/ijms222111905)