UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Vliv endoglinu na aktivaci jaterní fibrózy *in vitro*

Diplomová práce

Adéla Brejčáková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

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

V Hradci Králové: Podpis:

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Petře Fikrové, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, trpělivost a pomoc v laboratoři během celého procesu. Ráda bych poděkoval všem kolegům z laboratoře za jejich odborné rady a za pomoc, kterou mi poskytli během experimentální části. Zvláštní poděkování patří mé rodině, která mi byla oporou během celého studia.

1. OBSAH

1. OBSAH 4

2. ABSTRAKT 8

3. ABSTRACT 9

4. TEORETICKÁ ČÁST 10

4.1 Játra 10

4.1.1 Struktura jater 10

4.1.2 Anatomie a morfologie 10

4.1.3 Jaterní oběh 12

4.1.4 Funkce jater 14

4.1.5 Patofyziologie jater 15

4.1.5.1 NASH 15

4.1.5.2 Hepatitida 16

4.1.5.3 Jaterní selhání 16

4.1.5.4 Jaterní cirhóza 17

4.1.5.5 Ikterus 17

4.1.5.6 Diabetes mellitus 2 17

4.1.5.7 Portální hypertenze 18

4.1.5.8 Alkoholické onemocnění jater 18

4.1.5.9 Jaterní fibróza 18

4.2 HSC buňky 20

4.2.1 Charakteristika 20

4.2.2 Aktivace HSC 21

4.2.2.1 Regulační dráhy aktivace HSC 21
4.2.2.1.1 Hedgehog signální dráha 21
4.2.2.1.2 Wnt signální dráha 22
4.2.2.1.3 Notch signální dráha 22
4.2.2.1.4 TGFβ/BMP signální dráha 22
4.2.2.1.5 Tie2/Ang-1 signální dráha 22
4.2.2.1.6 FGF signální dráha 22
4.2.2.2 Metabolická regulace HSC 23
4.2.3 Vztah HCS a ECM 25
4.2.4 HSC a hepatocyty 25
4.2.5 HSC a LSEC 25
4.2.6 HSC a cholangiocyty 26
4.3 Endoglin 27
4.3.1 Exprese endoglinu 27
4.3.2 Struktura endoglinu 29
4.3.3 Signální dráha endoglinu 31
4.3.3.1 Endoglin v ovlivnění jaterní fibrózy 32
4.4 Carotuximab (TRC105) 33
4.4.1 Charakteristika 33
4.4.2 Carotuximab a BMP-9 33
4.5 PCR reakce 34
4.5.1 Princip PCR reakce 34
4.6 Průtoková cytometrie 34

4.6.1 Využití průtokové cytometrie 35

4.6.2 Instrumentace 35

5. ZADÁNÍ-CÍL PRÁCE 36

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 37

6.1 Chemikálie 37

6.2 HSC buňky 37

6.3 Design pokusu 38

6.4 qRT-PCR 39

6.4.1 Příprava před experimentem 39

6.4.2 Zpracování vzorků 39

6.4.3 Izolace RNA 39

6.4.4 Měření koncentrace RNA 40

6.4.5 Transkripce z RNA do cDNA 40

6.4.6 Příprava do 96-ti jamkové destičky 40

6.5 Intracelulární průtoková cytometrie p-SMAD 43

6.6 Statistická analýza 44

7. VÝSLEDKY A DISKUZE 45

7.1.1 Stanovení hladiny pSMAD 2/3 45

7.1.2 Exprese hladiny mRNA endoglinu 47

7.1.3 Exprese hladiny mRNA kolagenu 48

7.1.4 Exprese hladiny mRNA αSMA 49

7.1.5 Diskuze endoglinu, kolagenu a αSMA 50

8. ZÁVĚR 53

9. POUŽITÉ ZKRATKY 54

10. SEZNAM TABULEK 56

11. SEZNAM OBRÁZKŮ 57

12. SEZNAM GRAFŮ 58

13. POUŽITÁ LITERATURA 59

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce: Vliv endoglinu na aktivaci jaterní fibrózy *in vitro*

Autor: Adéla Brejčáková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.

Jaterní fibróza je dynamický proces charakteristický přeměnou jaterních hvězdicovitých buněk (HSC) na proliferativní myofibroblasty. Endoglin, který je vysoce exprimovaný v HSC, je transmembránovým glykoproteinem a působí jako koreceptor pro vazbu na transformující růstový faktor β (TGF-β). Jeho zvýšená exprese je spojována s patologickými stavy a je tedy významným markerem nádorových onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění a dalších. Z tohoto důvodu je endoglin cílovou molekulou pro terapeutické intervence. Carotuximab (TRC105) je monoklonální protilátka proti endoglinu. Váže se na sirotčí doménu endoglinu a ovlivňuje jeho signální dráhu prostřednictvím fosforylace SMAD.

Cíl práce: Cílem práce bylo zjistit, zda je carotuximab schopný snížit expresi endoglinu a tím zamezit rozvoji, nebo omezit progresi jaterní fibrózy v lidských jaterních hvězdicovitých buňkách.

Metody: Pro experimentální část jsme využili lidské HSC v pasáži č.3. Buňky byly kultivovány do dosažení 90% konfluence, poté byly ovlivněny médiem bez FBS obsahujícím 300 µg/ml TRC105 po dobu 4 hodin. Následně byla indukovaná fibróza přidáním TGF-β při koncentraci 5 ng/ml po dobu 24 hodin. Pro měření vybraných markerů jaterní fibrózy a její signální dráhy, které zahrnují kolagen, αSMA a SMAD2/3, stejně jako endoglin byly vybrány metody RT-PCR a průtoková cytometrie.

Výsledky a závěr: Výsledky ukázaly, že ovlivněním buněk pomocí TGF-β došlo k nárůstu markerů fibrózy (kolagen, αSMA) a endoglinu na úrovni mRNA. Po přidání protilátky (TRC105) došlo k snížení TGF-β indukované nadměrné expresi endoglinu, což mělo za následek podobné účinky na kolagen a αSMA, a zároveň vedlo ke snížení exprese pSMAD 2/3. Výsledky ukazují, že endoglin může hrát roli v procesu jaterní fibrózy a naznačují, že přímé blokování endoglinu a jeho signální dráhy, by mohlo mít ochranný antifibrotický efekt klíčový pro léčbu jaterních patologií.

3. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Science

Title of Diploma Thesis: The impact of endoglin on the activation of liver fibrosis *in vitro*

Author: Adéla Brejčáková

Supervisor of Diploma Thesis: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D

Liver fibrosis is a dynamic process characterized by the transformation of hepatic stellate cells (HSC) into proliferative myofibroblasts. Endoglin, which is highly expressed in HSC, is a transmembrane glycoprotein acting as a co-receptor for binding to Transforming Growth Factor β (TGF-β). It is increased expression is associated with pathological conditions and is thus a significant marker for tumor diseases, cardiovascular diseases, and others. For this reason, endoglin is a target molecule for therapeutic interventions. Carotuximab (TRC105) is a monoclonal antibody against endoglin. It binds to the orphan domain of endoglin and affects it is signalling pathway through SMAD phosphorylation.

Aim: The aim of the study was to determine whether carotuximab is capable of reducing endoglin expression and thereby preventing the development or limiting the progression of liver fibrosis in human hepatic stellate cells.

Methods: For the experimental part, we used human HSCs at passage number 3. The cells were cultured until reaching 90% confluence, then exposed to serum-free medium containing 300 μg/ml TRC105 for 4 hours. Subsequently, fibrosis was induced by adding TGFβ at a concentration of 5 ng/ml for 24 hours. To measure selected markers of liver fibrosis and it is signalling pathway, including collagen, αSMA, and SMAD2/3, as well as endoglin, RT-PCR and flow cytometry methods were employed.

Results: The results showed that treatment of the cells with TGF-β led to an increase in fibrosis markers (collagen, αSMA) and endoglin at the mRNA level. Following the addition of the antibody (TRC105), the excessive expression of endoglin induced by TGFβ was prevented, resulting in similar effects on collagen and αSMA, also led to a reduction in the expression of pSMAD2/3. The results show that endoglin may play a role in the process of liver fibrosis and suggest that direct blockade of endoglin and it is signalling pathway could have a protective antifibrotic effect crucial for the treatment of liver pathologies.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Játra

Játra *(hepar)* jsou jednou z největších exogenních žláz lidského těla. Hmotnost jater se pohybuje v rozmezí 1200-1800 g. Tato hmotnost představuje 2-3 % celkové tělesné hmotnosti. Játra jsou umístěna v oblasti pravé brániční klenby a chráněna hrudním košem. Jsou sídlem mnoha metabolických procesů. Probíhá zde metabolismus sacharidů, steroidních hormonů, tuků, ale i močoviny. Mimo jiné zde probíhá proces glukoneogeneze, tvorba žluči, cholesterolu, katabolismus aminokyselin, detoxikace, biotransformace léčiv, ketogeneze, glykolýza, syntéza glykogenu a mnoho dalších. Játra jsou také významným skladištěm ketolátek. (Dylevský, 2009)

4.1.1 Struktura jater

Játra jsou členěna na jednotlivé laloky. Pravý lalok *(lobus dexter),* levý lalok *(lobus sinister),* čtverhranný lalok *(lobus quadratus),* ocasatý lalok *(lobus caudatus)*. Povrch jater je kryt vazivovým Glissonovým pouzdrem *(tunica fibrosa).* (Ehrmann, Hůlek, 2010)

Vnitřní struktura jater je nerovnoměrná, což je dáno především uspořádáním parenchymu. Naopak uspořádání cév a žlučových kanálků je pravidelné. Členění vychází z Glissonovy triády. Ta je tvořena z jaterní žíly *(vena portae),* jaterní artérie a žlučových kanálků. Jaterní žíly se větví mezi jednotlivé triádové větve a tvoří cévní strom. Oproti tomu lymfatické cévy začínají v prostorech jaterních lalůčků a sbíhají se v mezenterické uzliny, ty poté doprovází cévní strom. (Ehrmann, Hůlek, 2010)

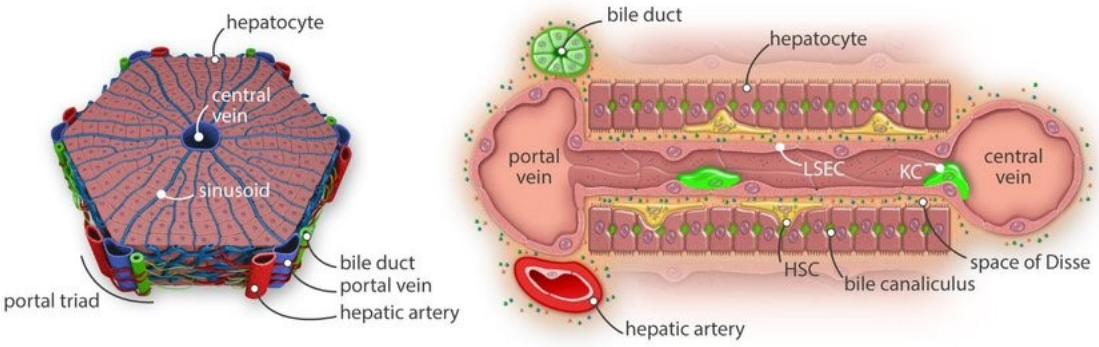
Stavební jednotkou jater je jaterní buňka *(hepatocyt),* která patří mezi epitelové buňky. Hepatocyty zaujímají až dvě třetiny jaterních buněk a tvoří parenchymatickou tkáň uspořádanou do trámců. Mezi jednotlivými trámci jsou cévy obklopené vazivovým pouzdrem *(capsula fibrosa perivascularis).* (Thompson, Takebe, 2021)

4.1.2 Anatomie a morfologie

Základní funkční mikrovaskulární jednotkou je lalůček centrální žíly *(lobus venae centralis)*, který má charakteristické uspořádání buněk okolo centrální žíly *(vena centralis)*. (obr. 1) Lalůček má specifickou cylindrickou strukturu o průměru několika málo milimetrů. V játrech dospělého člověka nalezneme až sto tisíc jaterních lalůčků, které mají trámčitou strukturu. Mezi trámci se nachází krevní kapiláry *(sinusoidy).* Stěna sinusoid je tvořena jednou

vrstvou endotelových buněk s četnými fenestracemi (otvory). Na luminální (vnitřní) stěně sinusoid se nachází Kupfferovy a endotelové buňky. Prostor mezi buňkami endotelu a hepatocyty se poté nazývá *Disseho* prostor. (Ishibashi *et al.,* 2009)

Obrázek 1. Detail jaterního lalůčku



Schématické znázornění jaterního lalůčku a jeho architektury. Levá část obrázku zobrazuje strukturu jaterního lalůčku s portální triádou tvořenou portální žilou, jaterní tepnou a žlučovodem. Krev proudí přes sinusoidy do centrální žíly. V pravé části obrázku je znázorněna lokace jaterních sinusoidálních endotelových buněk (LSEC) a jaterních hvězdicovitých buněk (HSC). KC je Kupfferova buňka. Obrázek zobrazuje směr toku krve v jaterním lalůčku. Vidíme zde i umístění hepatocytů. (Van Grunsven, 2017)

Kromě hepatocytů a Kupfferových buněk se v játrech vyskytují i další neparenchymové buňky. Jedny z nich jsou jaterní hvězdicovité buňky (hepatic stellate cells - HSC) známé také jako Itovy buňky. Příkladem dalších neparenchymových buněk jsou buňky endotelové, epitelové nebo Pitovy. HSC buňky slouží především k sekreci vaziva a jejich úkolem je i skladování esterů retinolu. (Ishibashi *et al.,* 2009) Pitovy buňky patří do skupiny lymfocytů, nacházející se v oblasti jaterních sinusoid. Jsou popisovány jako přirození zabíječi (NK buňky), a hrají roli v udržování imunity organismu. Jejich hlavním úkolem je zprostředkování antigen-specifické imunitní odpovědi. (Luo, 2000; Peng *et al.,* 2016)

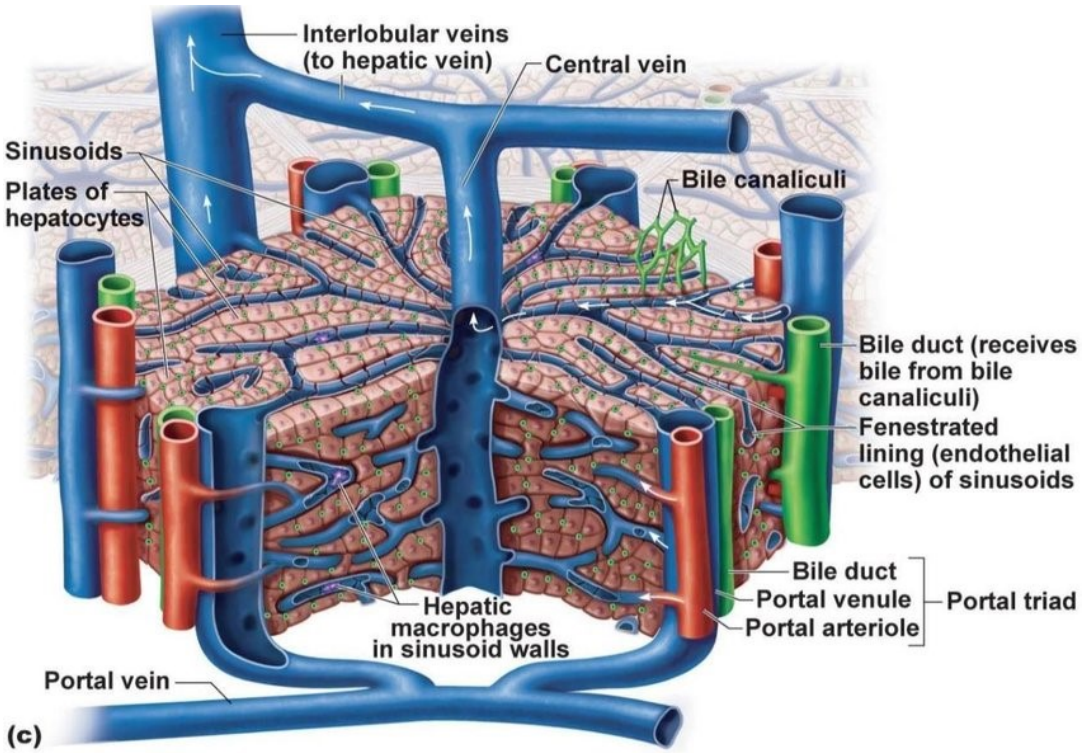
Jak již bylo zmíněno výše, bariéru mezi krví a hepatocyty tvoří endotelové buňky. Mezi těmito buňkami se nachází značné fenestrie. Dochází zde také k velkému vychytávání látek z krevního řečiště. Vychytávají se tu látky jako je transferin, ceruloplazmin nebo modifikované lipoproteiny. Mezi ty můžeme zařadit například lipoproteiny vysoké hustoty (HDL) nebo lipoproteiny nízké hustoty (LDL). Tyto buňky mají mimo jiné schopnost syntézy prostacyklinu, prostaglandinu E a cytokinů. (Ehrmann, Hůlek, 2010)

4.1.3 Jaterní oběh

Živiny a krev jsou do jater přiváděny bohatým cévním řečištěm. Játra potřebují pro svou činnost v klidu až 25 % srdečního výdeje, což má za následek, že jaterní buňky patří mezi jedny z nejlépe zásobených v celém organismu. (Lautt, Macedo, 2010) Celkový průtok krve játry je poměrně velký a může činit až 1,5 litru za minutu. (Dylevský, 2009)

Jaterní oběh je zabezpečován vrátnicovou žilou *(venou portae),* která shromažďuje krev z orgánů dutiny břišní, jako jsou žaludek, slezina, slinivka břišní nebo žlučník. Vrátnicová žíla vstupuje do jater v příčné vkleslině jater *(porta hepatis)* a je dělena na dvě větve, které se dále rozdělují až do jaterních lalůčků. Příčná vkleslina jater je vstupní branou, jak pro vrátnicovou žílu, tak pro jaterní tepnu. (Dylevský, 2009) Do jater je krev přiváděna jaterní tepnou zásobující převážně hepatocyty. Jaterní tepna se dělí až do vlásečnic, které se shromažďují v okolí centrální žíly *(vena centralis).* Postupně ústí do jaterní žíly *(vena hepatica).* (Gaikwad, 2022) Jaterní žíla poté vede krev přes dolní dutou žílu *(vena cava inferior)* do pravé srdeční síně. (Ehrmann, Hůlek, 2010) Vstupy se tedy nacházejí v periportální oblasti a výstupy v oblasti periferie. Tímto rozdělením se tak mohou tvořit tlakové gradienty pro látky, které vstupují nebo vystupují z krve, jako například kyslík. (Abshagen *et al.,* 2014)

Obrázek 2. Zásobení jaterního lalůčku



Obrázek znázorňuje jaterní lalůček. Šipkami je znázorněný tok krve do centrální žíly. Krev je přiváděna portální žilou (c) a odváděna centrální jaterní žílou do mezi-lalůčkové žíly. Na obrázku dále můžeme vidět žlučové kanálky a umístění makrofágů v oblasti jaterních sinusoid. V rozích se nacházejí portálové triády, skládající se ze žlučového kanálku, portální tepny a portální žíly. (Doe, 2023)

4.1.4 Funkce jater

Játra hrají zásadní roli v metabolismu. Podílejí se na udržování hladiny glukózy, detoxikaci organismu a vylučování xenobiotik. Probíhá zde syntéza proteinů a konzervace žlučových kyselin. V jaterní tkáni dochází k metabolismu sacharidů. Mezi tyto sacharidy patří např. glykogen, glukóza, galaktóza a fruktóza. Dále zde dochází ke zpracování lipoproteinů, mastných kyselin a cholesterolu. Játra jsou sídlem metabolismu dusíkatých látek, kam se řadí například aminokyseliny, močovina nebo kreatin. (Kelly, 2011)

V játrech také probíhá syntéza proteinů jako jsou albumin, angiotensinogen, α1-fetoprotein, alfa1-antichymotripsin, ceruloplasmin. Kromě proteinů se zde vytváří i srážecí faktory, jako je faktor 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 a 12. V játrech dochází i k syntéze proteinových inhibitorů koagulace, fibrinolytických faktorů, inhibitorů fibrinolýzy, transportních proteinů, apolipoproteinů i steroidních hormonů. Jsou místem syntézy kalikrein-kininového systému. V játrech se uvolňují proteiny akutní fáze, takže jsou nedílnou součástí zánětlivé reakce. Mimo jiné syntetizují i proteiny komplementového systému od C1 až C9. Játra jsou zároveň skladištěm vitaminů A, E, K, B1, B6, B12, mědi, železa a slouží k aktivaci vitaminu D. (Wilhelm, Hegyi, 2007)

Syntézy jednotlivých metabolitů probíhají v játrech na třech různých zónách. V zóně jedna převažují oxidační děje jako je například beta oxidace mastných kyselin, katabolismus aminokyselin, glukoneogeneze, syntéza cholesterolu nebo tvorba žluči. První zóna je tvořena především hepatocyty, které jsou bohatě zásobené okysličenou krví. Zóna dva je zónou přechodnou a tvoří spojku mezi zónou jedna a tři. Ve třetí zóně se nachází hepatocyty, které jsou živeny krví o snížené koncentraci kyslíku. Probíhají zde děje jako je syntéza glykogenu, glykolýza, lipogeneze, ketogeneze, syntéza žlučových kyselin nebo biotransformace xenobiotik. (Ehrmann, Hůlek, 2010)

4.1.5 Patofyziologie jater

Jaterní onemocnění můžeme klasifikovat do dvou základních kategorií: na akutní a chronická. Mezi akutní patří ty, u kterých pozorujeme symptomy po maximálně 26 týdnů, naopak chronická jsou perzistentní. U chronických onemocnění dochází k trvalým změnám ve struktuře jater a to především k poškození hepatocytů. (Zhang, Meng, 2022; Luo *et al*., 2023)

Mezi hlavní příčiny jaterních onemocnění patří alkohol, infekce jako je hepatitida, genetické predispozice (Wilsonova nemoc, Budd-Chiari syndrom), imunitní abnormality nebo nádorové bujení. Kromě výše zmíněného patří mezi příčiny jaterních onemocnění i léky na snížení cholesterolu, nesteroidní antiflogistika (NSAIDs), acetaminofen (paracetamol), karbamazepin nebo fenytoin. (Toma *et al.,* 2020)

4.1.5.1 NASH

Nealkoholická steatohepatitida (NASH) je jedna z forem nealkoholického ztučnění jater (NAFLD). Onemocnění je charakteristické ukládáním tuku v játrech, doprovázené zánětem. Depozitace tuku probíhá mimo jiné z důvodu silné inzulinové rezistence a oxidačního stresu. Na rozvoji inzulinové rezistence se podílí jak nárůst tukové tkáně, tak diferenciace tukových buněk (adipocytů). Adipocyty vylučují adipokiny, které zahrnují především tumor nekrotizující faktor (TNF). Kompenzačním mechanismem v reakci na inzulinovou rezistenci dochází k rozvoji hyperinzulinémie. Díky hyperinzulinémii se zvyšuje počet volných mastných kyselin proudících do jater a dochází k jejich akumulaci. (Liu *et al.,* 2021) Hyperinzulinémie může způsobovat rozvoj oxidačního stresu. Oxidační stres má multifaktoriální etiologii a kromě hyperinzulinémie může být způsoben produkcí zánětlivých cytokinů pomocí Kupfferových buněk, přetížením v důsledku nadbytku železa nebo lipidovou peroxidací. Při lipidové peroxidaci dochází převážně k tvorbě peroxidu vodíku, superoxidu a peroxidu lipidů. Kromě Kupfferových buněk hrají v patogenezi NASH roli i jiné makrofágy, ovlivňující HSC. (Zhu *et al*., 2021)

4.1.5.2 Hepatitida

Hepatitida je systémové jaterní onemocnění způsobené neobaleným RNA virem. Hlavní příčinou poškození jater je odpověď imunitního systému. Nadměrná imunitní reakce na virové napadení může vést k zánětu a poškození jaterní tkáně. Virus hepatitidy má několik subtypů. Prvním je hepatitida A, což je nejrozšířenější typ hepatitidy. Infekce se šíří orální cestou. Hepatitida B je naopak přenosná krví, pohlavním stykem nebo z matky na plod. Hepatitida B může přecházet do chronicity a způsobovat chronickou hepatitidu, jaterní cirhózu nebo hepatocelulární karcinom (HCC). Stejným způsobem jako hepatitida B se šíří infekce hepatitidy C. Hepatitida C je nebezpečná hlavně díky tomu, že je po většinu času bezpříznaková. Projeví se až v důsledku pokročilých jaterních onemocnění. Je jednou z hlavních příčin rozvoje HCC. Hepatitida D se přenáší parenterálně, a to především krví. Dnes se toto onemocnění vyskytuje převážně v zemích, jako je například Tunisko. Posledním subtypem je hepatitida E. Hepatitida E je přenosná především enterálně. Tento typ hepatitidy představuje komplexní hrozbu pro zdraví těhotné ženy a plodu, který zahrnuje riziko potratu, mrtvého plodu, vrozené hepatitidy a mateřské úmrtnosti, zejména ve třetím trimestru. (Hůlek, Urbánek, 2018)

4.1.5.3 Jaterní selhání

Akutní jaterní selhání je vzácné onemocnění, probíhající nejčastěji v důsledku napadení virem hepatitidy nebo v případě užívání léků, jako je například paracetamol. V průběhu nemoci dochází k nekróze jaterního parenchymu a úplnému zničení jaterních lalůčků. Nekróza je způsobená nedostatkem adenosintrifosfátu (ATP), který vede k narušení buněčných membrán. (Stravitz, Lee, 2019) Chronické jaterní onemocnění je charakteristické postupným zhoršováním jaterních funkcí, které může vést ke zvýšení tlaku v portálním řečišti, snížení krevních destiček *(trombocytů)*, snížení syntézy koagulačních faktorů, v některých případech až k jaternímu kómatu a smrti. Tento proces vede k jaterní fibróze a cirhóze. (Nečas *et al.,* 2006)

4.1.5.4 Jaterní cirhóza

Jaterní cirhóza je chronické jaterní onemocnění charakteristické fibrotizací. Probíhá strukturní změna jaterního parenchymu, která je v časných stádiích ještě stále vratným dějem. Nejčastější příčinou jsou hepatitida, metabolické poruchy nebo venostáza v důsledku srdečního selhání. Následkem jaterní cirhózy je porucha jaterních buněk, doprovázená portální hypertenzí. Tyto aspekty vedou v mnoha případech k rozvoji HCC. (Schuppan, Afdhal, 2008) Při jaterní cirhóze dochází k hromadění kolagenu, který omezuje průtok krve. Je spojena se ztrátou fenestrované struktury sinusoid a zhoršeným pohybem bílkovin. (Zhang *et al*.,2023)

4.1.5.5 Ikterus

Ikterus, neboli žloutenka, také známá jako hyperbilirubinémie, je výsledkem nahromadění bilirubinu. Působí jako základní indikátor onemocnění jater. Mezi příčiny patří defekt transportu iontů, Dubin-Johnsův syndrom, hepatocelulární virová onemocnění, jako je hepatitida, cirhóza anebo onemocnění zasahující imunitní systém. Dále mohou hyperbilirubinémii způsobovat i léky, jako například chlorpromazin, steroidy, probenecid nebo hormonální antikoncepce. Ikterus lze rozdělit na tři základní kategorie, a to prehepatický, hepatický a posthepatický. (Roche, Kobos, 2004)

4.1.5.6 Diabetes mellitus 2

Diabetes mellitus je chronické endokrinní onemocnění, úzce související s rozvojem inzulinové rezistence. Onemocnění si můžeme rozdělit na dva typy. Diabetes mellitus druhého typu je rizikovým faktorem jaterního onemocnění, jako je například jaterní fibróza. Jelikož játra hrají klíčovou roli v regulaci hladiny glukózy, jaterní dysfunkce vede k rozvoji inzulinové rezistence. Inzulinová rezistence pak vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi. Díky perzistující glykémii dochází k nadměrné akumulaci produktů glykace a dochází tak ke zvyšování oxidačního stresu. Oxidační stres poté vede k poškozování hepatocytů a k následné fibrotizaci. Dlouhotrvající glykémie je charakteristická pro diabetes mellitus prvního typu. Na rozdíl od diabetu mellitu druhého typu zde nedochází k rozvoji inzulinové rezistence. Diabetes mellitus prvního typu tudíž není spouštěčem dalších jaterních onemocnění. (Popoviciu *et al*., 2023)

4.1.5.7 Portální hypertenze

Portální hypertenze je označení pro zvýšený tlak objevující se v portální žilním systému. Je určena rozdílem tlaků mezi portálním venózním tlakem a tlakem v dolní duté, nebo jaterní žíle. Mezi příčiny portální hypertenze patří obstrukce v portální nebo slezinové žíle, dysfunkce jaterních endotelových buněk (LSECs), arteriální deformace nebo trombóza. Příčinou změny cirkulace může být také aktivace hvězdicových buněk, související s procesem fibrotizace. Portální hypertenze může být klasifikována na prehepatální, intrahepatální nebo posthepatální. (Mcconnell, Iwakiri, 2018)

4.1.5.8 Alkoholické onemocnění jater

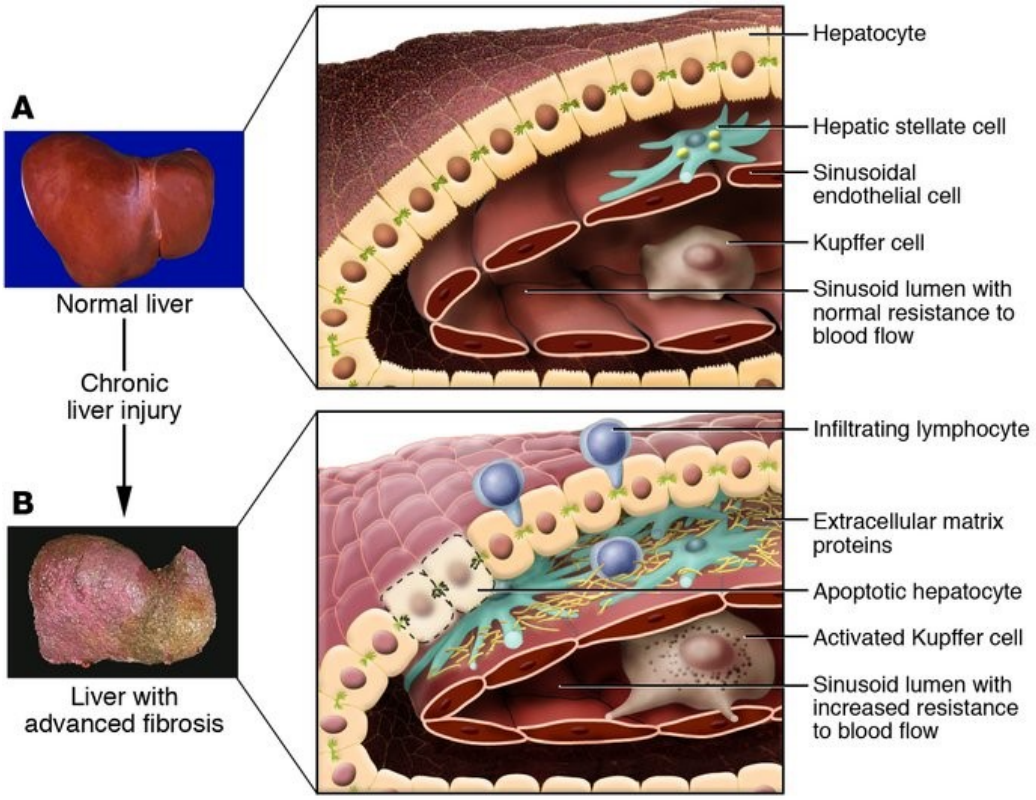
Alkoholem způsobená jaterní onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin morbidity a mortality související s játry. Alkohol je v játrech metabolizován pomocí dvou enzymů. Prvním je alkohol dehydrogenáza a druhým aldehyd dehydrogenáza. Nadbytečný příjem alkoholu vede k poruše rovnováhy mezi množstvím enzymů a výslednými produkty, tudíž dochází k tvorbě glycerolfosfátu. Glycerolfosfát poté vytváří komplex s mastnými kyselinami a vznikají triglyceridy, které se hromadí v játrech a způsobují jejich ztučnění. (Hyun *et al*., 2021) Alkoholické onemocnění jater je termín používající se pro skupinu několika onemocnění, jako je jaterní steatóza, fibróza, cirhóza a hepatitida. Mezi nejvíce závažná onemocnění patří alkoholická hepatitida, která je často spojována s jaterním selháním. (Louvet, Mathurin, 2015)

4.1.5.9 Jaterní fibróza

Jaterní fibróza je onemocnění, při kterém dochází k nadměrné akumulaci mezibuněčné hmoty (extracellular matrix-ECM) a proteinů včetně kolagenu. Může vést k cirhóze, selhání jater nebo portální hypertenzi a ve většině případů vyžaduje transplantaci jaterní tkáně. Vzniká především v důsledku poškození jater spojeného s akumulací extracelulárních proteinů. Tato akumulace narušuje architekturu jater a v důsledku regenerace dochází k tvorbě jizev a uzlů. Pokud není regenerace dostatečná, dochází k nahrazení hepatocytů ECM, včetně fibrilárního kolagenu (obr. 3). Kolagen produkují aktivované buňky, jako jsou například HSC nebo fibroblasty. Aktivace probíhá pomocí fibrogenních cytokinů, jako jsou transformující růstový faktor (TGF-β), angiotensin II nebo leptin. Fibróza je mimo jiné spojena s produkcí trombocytového růstového faktoru (PDGF), který je produktem Kupfferových buněk. Regulace jaterní fibrózy probíhá pomocí několika regulačních drah. Příkladem může být vnitrobuněčná signální dráha zahrnující SMAD proteiny, která je aktivovaná pomocí TGF-β 1. Mimo jiné je také

cílem specifické monoklonální terapie. Další dráha vede přes peroxisom proliferátor-aktivovaný receptor (PPAR), který reguluje aktivaci HSC buněk. (Bataller, Brenner, 2005)

Obrázek 3. Jaterní fibróza



Na obrázku jsou vidět změny v architektuře zdravých jater (A) a jater s pokročilou fibrózou (B). Ve fibrotických játrech dochází k infiltraci jaterního parenchymu pomocí lymfocytů. Dochází k aktivaci Kupfferových buněk (Kupffer cell) a uvolnění fibrogenních mediátorů. Díky těmto procesům dochází k apoptóze některých hepatocytů (apoptotic hepatocyte). Dochází k proliferaci HSC a vylučování proteinů extracelulární matrix (extracellular matrix proteins). Fenestrovaná struktura sinusoidálních buněk se vytrácí a zvyšuje se rezistence vůči průtoku krve jaterní sinusoidou (sinusoid lumen with increased resistence to blood flow). (Bataller, Brenner, 2005)

4.2 HSC buňky

4.2.1 Charakteristika

Hepatic stellate cells, známé také jako Ito buňky, patří mezi specifické buňky náležící do rodiny myofibroblastů. HSC vykazují dendritickou strukturu, obklopují sousední endotelové buňky a úzce komunikují s hepatocyty a Kupfferovými buňkami. Podílejí se na zjednodušení transportu mediátorů a cytokinů. (Senoo, 2004; Hellerbrand, 2013) HSC se charakteristicky nacházejí v *Disseho* prostoru mezi parenchymatickými a sinusoidálními endotelovými buňkami. HSC se nenacházejí pouze v játrech, ale podobné buňky najdeme je i v orgánech, jako jsou slinivka břišní *(pankreas),* plíce, ledviny nebo střeva. Tvoří tedy vysoce organizovaný buněčný systém. (Gandhi, 2015)

HSC buňky jsou zapojeny do syntézy kolagenu a glykoproteinů. Uchovávají až 80 % retinoidů celého organismu, a to ve formě retinyl palmitátu v cytoplasmě. Za fyziologických podmínek hrají důležitou roli v regulaci jeho homeostázy a zároveň exprimují protein vázající retinol. Produkují také růstové faktory, cytokiny a prostaglandiny. (Senoo, 2004) Růstové faktory jsou důležité především pro regeneraci a aktivaci imunitního systému. (Čihák, 2016) HSC buňky jsou specifické i z toho důvodu, že mohou v omezené kapacitě vystupovat jako buňky prezentující antigen (APC). Jejich potenciál tkví v možnosti exprimovat ligand pro programovanou buněčnou smrt, a tím pádem mají možnost indukovat apoptózu. Příkladem může být apoptóza T-buněk a inhibice cytokinových antigenů (CD8). HSC buňky produkují cytokiny a chemokiny a jsou schopné exprimovat, či regulovat hlavní buňky histokompatibilního komplexu (MHC) I a II. Charakteristické rysy HSC buněk hrají roli v orgánových transplantacích a mohou hrát také roli v bakteriálních infekcích. Jejich role je také důležitá v regulaci zánětu. Vystavení stimulům může vést k většímu ukládání kolagenu a tvorbě vaziva, což vede k fibróze a cirhóze. (Borges *et al.,* 2012)

Ve stresové situaci je pro HSC typické, že se aktivují a způsobují up-regulaci hladkosvalových buněk. (Meurer, Weiskirchen, 2020) Aktivace vede ke zmnožení filamentárního skeletu, který způsobuje přeměnu HSC na myofibroblastické buňky. Vše je doprovázeno vyplavováním velkého množství látek, které jsou součástí složek mezibuněčné hmoty. Mezi takové složky zařadíme např. kolagen, proteoglykan nebo adhezivní glykoproteiny. Součástí skupiny proteinů je například PDGF-β růstový receptor, lecitin retinol

enzym, lecitin retinol acetyltransferasa (LRAT), desmin, gliární fibrilární kyselý protein (GFAP) nebo protein II. (Tsuchida, Friedman, 2017)

4.2.2 Aktivace HSC

Při aktivaci HSC v játrech dochází k významným funkčním změnám. Z proliferativních buněk, které se aktivně dělí, se stávají migrující buňky, které se pohybují do poškozené tkáně. Tyto buňky se pak diferencují na buňky produkující fibrinogen, který je důležitou součástí hojivého procesu. Takto přeměněné buňky se nazývají myofibroblasty. Aktivaci HSC buněk modulují cytokiny, adipocyty, toll-like receptory (TLR), IL, kolagenové receptory, G proteinové receptory, oxidační stres, genetické faktory, buněčný metabolismus, a mnoho dalších. Přeměna HSC je komplexní proces, který zahrnuje spolupráci s řadou dalších buněk, včetně hepatocytů, sinusoidálních endotelových buněk, T-buněk a NK buněk. Tyto buňky poskytují různé signály, které napomáhají diferenciaci a aktivaci HSC. (Hou, Syn, 2018)

Aktivace HSC zahrnuje dva hlavní mechanismy: vnější (extracelulární) a vnitřní (intracelulární) aktivaci. Vnější faktory představují infekce, viry, metabolické poruchy nebo alkohol. Mezi vnitřní faktory zařadíme například cytokiny nebo různé signální dráhy. Signální dráhy, podílející se na aktivaci, jsou například TGF-β, Notch, Wnt/β-katenin nebo Hedgehog signální dráha. Tyto dráhy se vzájemně propojují a spolu s vnějšími faktory způsobují změnu fenotypu HSC. Činnost aktivovaného fenotypu může být dále zesílena pomocí cytokinů nebo růstových faktorů. (Yan *et al*., 2021)

4.2.2.1 Regulační dráhy aktivace HSC

4.2.2.1.1 Hedgehog signální dráha

Hedgehog dráha (Hh) je kanonická, vysoce komplexní signální dráha, která hraje zásadní roli v embryonálním vývoji mnoha orgánů. Aktivace Hh signalizace značně podporuje aktivaci HSC na profibrogenní buňky. (Gao *et al.,* 2018) Inhibicí Hh dráhy by tak mohlo docházet k inhibici aktivace HSC. Aktivace Hh naopak indukuje apoptózu a zesiluje proliferaci myofibroblastů. Její deregulace tak může být důsledkem rozsáhlejšího poškození jater. (Lim, Matsui, 2010; Merchant, Matsui, 2009)

4.2.2.1.2 Wnt signální dráha

Wnt (wingless/Int-1) je dráha řídící buněčný růst, diferenciaci, migraci a podílí se na udržování homeostázy. Dráha je rozdělena na dvě základní cesty. První cesta je závislá na β-kateninu, druhá naopak závislá není. (Azbazdar *et al*., 2021)

4.2.2.1.3 Notch signální dráha

Dráha regulující proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt. Notch je receptor, nacházející se na povrchu buňky. Jeho úkolem je přenášet signály pomocí interakce s transmembránovými ligandy. (Kopan, 2012)

4.2.2.1.4 TGFβ/BMP signální dráha

TGF-β rodina je jedna z významných signalizačních rodin. Obsahuje 33 ligandů a několik receptorů. Ligandy této dráhy lze rozdělit na TGF-β ligandy, rodinu kostního morfogenetického proteinu (BMP), růstovou a diferenciační rodinu (GDF), aktivinovou rodinu (Act) a jiné. (Thielen *et al.,* 2019) Dráha obsahuje kromě ligandů, tři typy receptorů a signální proteiny nazývané SMADs. Při aktivaci dochází k fosforylaci SMAD, která poté vede k tvorbě komplexu, který přechází do jádra, kde reguluje expresi cílových genů. Tato signální dráha hraje důležitou roli v embryogenezi, buněčném růstu a metabolismu, ale taky patogenezi řady nemocí. (Guo, Wang, 2009; Kim *et al*., 2019)

4.2.2.1.5 Tie2/Ang-1 signální dráha

Signální dráha Angiopoientin-1/Tie-2 podporuje přežití endotelových buněk, vaskulární sestavení, stabilitu a angiogenezi. Ang-1 (angiopoientin) je ligand a přímý agonista pro receptor Tie-2, který vykazuje kinázovou aktivitu. (Thurston, Daly, 2012) Signální dráhy hrají klíčovou roli v regulaci široké škály fenotypových vlastností cév od propustnosti a pučení, až po apoptózu. Tyto dráhy ovlivňují různé aspekty cévní biologie, včetně integrity cévní stěny, angiogeneze a remodelaci cév. (Fukuhara *et al.,* 2010)

4.2.2.1.6 FGF signální dráha

Signalizace fibroblastového růstového faktoru (FGF) způsobuje potlačení aktivity BMP. (Pouget *et al.,* 2014) FGF jsou polypeptidové růstové faktory, které jsou součástí vývoje jak embryonálního, tak homeostázy. (Yeoh *et al*., 2006)

4.2.2.2 Metabolická regulace HSC

Metabolická regulace zahrnuje autofágii, stres endoplazmatického retikula, oxidační stres, retinolový metabolismus, volný cholesterol a adipocytokiny. Autofágie je proces buněčné recyklace, úzce spolupracující s proteinem ubikvitinovým modifikátorem aktivujícím fibrinogenezi (UFAM) v regulaci aktivace HSC. Autofágie štěpí retinylové estery mastných kyselin pro uvolnění vitaminu A, zatímco ubikvitinový modifikátor aktivující fibrinogenezi zajišťuje degradaci proteinů, potlačujících aktivaci HSC. Aktivace HSC v jaterních onemocněních je částečně řízena reaktivními formami kyslíku (ROS) produkovanými poškozenými hepatocyty. Tyto ROS působí jako prozánětlivé faktory a aktivují specifické signální dráhy v HSC, které vedou k jejich proliferaci a diferenciaci na myofibroblasty, klíčové buňky fibrinogeneze. ROS jsou zároveň regulovány pomocí transmembránového komplexu, který je tvořen hydrogenovanou NADPH oxidázou (NOX). Ztráta nebo inhibice NADPH vede ke zmírnění nebo zpomalení procesu jaterní fibrotizace. (Yang *et al.,* 2021)

Metabolismus retinolu úzce souvisí s regulací aktivace HSC. Ztráta lipidových kapiček retinoidů aktivuje HSC, zatímco jejich ukládání s cholesterolem aktivaci HSC posiluje. Retinol je v HSC metabolizován na retinylester enzymem lecitin retinol acetyltransferasou, dále na oxidující formu retinaldehyd enzymem alkohol dehydrogenázou (ADH). Retinaldehyd je následně transformován na kyselinu retinovou. ADH má důležitou roli v procesu fibrotizace tím, že posiluje aktivaci HSC, naopak inhibuje NK buňky. Inhibicí ADH zvyšujeme cytotoxicitu NK buněk proti HSC a dochází ke snížené expresi kolagenu. Retinol zároveň koriguje expresi patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3), což je protein regulující přeměnu retinylpalmitátu na retinol a palmitát. Jestliže dochází ke zvýšené expresi patatin-like phospholipase domain-containing proteinu 3, dochází ke snížení množství lipidových kapiček. Volný cholesterol v HSC ovlivňuje jejich aktivaci a fibrogenezní potenciál prostřednictvím downregulace TGF-β a membránově vázaného inhibitoru BMP a aktivinu (BAMBI). Tyto signální dráhy obvykle potlačují aktivaci HSC, ale jejich narušení volným cholesterolem vede k deregulaci a nadměrné aktivaci HSC. Cholesterol je metabolizován pomocí acyl-coA cholesterol acyltransferasy (ACAT). Nedostatek tohoto enzymu tak může způsobit jaterní fibrózu bez jiné další příčiny.

Adipocytokiny jsou nedílnou součástí jaterní fibrózy a přispívají k jejímu rozvoji zejména u obézních pacientů trpících nealkoholickým onemocněním jater. Interakce mezi adipocytokiny mohou přímo působit na aktivaci HSC. Adipocytokiny obsahují adiponektin a leptin. Leptin působí na rozdíl od adipolektinu profibrogenně. Adiponektin má tu vlastnost, že

napomáhá potlačovat proliferaci a migraci. Mechanismus aktivace je spojen se ztrátou schopnosti ukládání lipidových částic a down-regulací exprese gliálního fibrilárního proteinu (GFAP), mimo jiné i gama receptoru pro proliferátorem aktivované peroxisomové receptory. Aktivované HSC migrují do míst, spolu s ECM. K aktivaci HSC vedou i mediátory, jako jsou protein růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF), leptin, IL-6, IL-13, IL-17. Účinným induktorem byl prokázán TGF-β pomocí heterotetrametrického receptorového komplexu obsahujícího TGF-β receptory typu 1 a 2, které dále vedou k aktivaci intracelulárních cest, jako je např. SMAD 2/3.

HSC spolu s hepatocyty projevují zvýšený oxidační stres a mitochondriální poškození při expozici faktorů při poranění. Zvýšená exprese profibrotických faktorů jako jsou osteopontin (OPN), TGF-β a transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) přímo podporuje aktivaci HSC. Aktivované HSC a poškozené hepatocyty působí recipročně pomocí ten-eleven translocation (TET3) /TGF-β1 jako pozitivní zpětná vazba a retinol, který aktivované HSC uvolňují, by mohl být absorbován hepatocyty, takže dochází k dalšímu ukládání lipidů. Mezi pro-regeneraci a pro-fibrózou HSC jsou fenotypové rozdíly, které hrají důležitou roli v interakci s hepatocyty. Ovlivnění jak hepatocytů, tak HSC by tak mohlo vést k synergii účinku terapie. Aktivované HSC potom mohou reagovat na další stimuly, jako jsou cytokiny nebo růstové faktory makrofágů, tudíž dochází ke zvýšené proliferaci a fibrinogenezi.

Aktivace HSC buněk je složena ze dvou fází, a to iniciace a perpetuace. Iniciace je důsledkem parakrinní stimulace apoptických tělísek, oxidačního stresu a bakterií. Endotelové buňky se také účastní přeměny latentního TGF-β na jeho aktivní formu a produkuje se fibronektin, který aktivuje HSC buňky. Aktivace HSC buněk může být i prostřednictvím trombocytů, které produkují PDGF a TGF-β, a taktéž epidermální růstový faktor. Tyto faktory vedou k další aktivaci HSC. Aktivované HSC se nachází ve velkém množství především v kolagenních pásech cirhotických jater, kterými omezují průtok krve přes *vena portae* a sinusoidy. Mohou tak přispívat k portální hypertenzi. Mezi hlavní regulátory kontrakce patří endotelin-1 a oxid dusnatý (NO). Nejúčinnějším profibrinogenním cytokinem je TGF-β, který podporuje diferenciaci HSC na myofibroblasty a zároveň stimuluje tvorbu kolagenu. (Tsuchida, Friedman, 2017)

4.2.3 Vztah HCS a ECM

Zdravá játra produkují ECM bohatou na laminin, kolagen IV a proteoglykany. Ve fibrotických játrech dominuje kolagen I a III, tvořící fibrily. HSC exprimují dva typy kolagenových receptorů: integriny a receptory obsahující doménu diskoidinu DNA damage response (DDR). Tyto receptory vnímají signály z ECM a regulují tak adhezi, diferenciaci, proliferaci a migraci HSC. Domény diskoidinu DNA damage response, aktivují HSC v reakci na kolagen a přispívají k fibróze. Integriny mohou zase ovlivňovat TGF-β signalizaci, čímž se rovněž podílejí na aktivaci HSC. (Tsuchida, Friedman, 2017)

4.2.4 HSC a hepatocyty

Hepatocyty při patologických stavech zvyšují hladinu oxidačního stresu a dochází tak k poškození mitochondrií. Interakce mezi HSC a hepatocyty je zajištěna pomocí ligandů. Dochází ke zvýšení profibrotických faktorů, což podpoří aktivaci HSC. Zánik hepatocytů, je doprovázen uvolněním ROS, nukleových kyselin a Hh ligandů. Poškozené hepatocyty spolu s aktivovanými HSC působí jako pozitivní zpětná vazba přes signální dráhu TET3/TGF-β1. (Yang *et al*., 2021)

4.2.5 HSC a LSEC

Jaterní sinusoidální endotelové buňky (LSEC) regulují výměnu metabolitů mezi hepatocyty a krví v jaterních sinusoidách. Jaterní sinusoidální buňky mají fenestrovanou strukturu a jsou plně diferenciované. Díky sekreci oxidu dusnatého udržují klidový fenotyp HSC. V patologických stavech, ale jaterní sinusoidální buňky ztrácejí fenestraci a mění fenotyp. Dochází k expresi TGF-β1, PDGF, endotelinu, Hh ligandu a tím pádem k aktivaci HSC. Aktivace vede k narušení difúze kyslíku v krvi a dochází k hypoxii. Hypoxie vede k remodelaci kolagenních vláken a dochází k další aktivaci HSC. Aktivované HSC pak působí na klidové HSC a jaterní sinusoidální buňky pomocí TGF-β1 a dochází k většímu rozvoji jaterní fibrózy. Fenotypově změněné jaterní sinusoidální buňky vylučují exosomy, které osahují sfingosinkinázu-1, podporující migraci a aktivaci HSC. Aktivované HSC tak mohou uvolňovat exosomy obsahující Hh ligandy, které mění expresi genů jaterních sinusoidálních buněk. Inhibicí jaterních sinusoidálních buněk může vést k obnově aktivovaných HSC. Ty se pak udržují ve svém klidovém fenotypu. (Tsuchida, Friedman, 2017)

4.2.6 HSC a cholangiocyty

Cholangiocyty jsou buňky žlučového systému, které mají klíčovou roli v tvorbě, transportu a regulaci žluči, která je nezbytná pro trávení a vstřebávání tuků. Kromě jiného slouží také k ochraně před patogeny. Aktivují se v reakci na zranění, infekci nebo ischémii. Aktivované cholangiocyty vedou k aktivaci žlučovodových epitelových buněk, které začnou produkovat zánětlivé cytokiny a chemokiny. Dochází k šíření zánětlivé reakce a podpoře proliferace fibroblastů. S tím souvisí i přeměna HSC na myofibroblasty. Aktivace je regulována dráhou TGF-β/SMAD, vedoucí nejen k aktivaci HSC, ale i k podpoře fibrotického fenotypu cholangiocytů. (Yang *et al.,* 2021)

4.3 Endoglin

Endoglin, také známý jako CD105, je homodimerický transmembránový glykoprotein o hmotnosti 180 kDa. Zároveň je koreceptorem pro ligandy transformujícího růstového faktoru β (TGF-β). Je exprimován na povrchu různých typů buněk, nejčastěji však na endotelových cévních buňkách. Existují dvě formy endoglinu a to solubilní, cirkulující v krevním řečišti, a membránový. Díky své struktuře hraje klíčovou roli v regulaci buněčných procesů a angiogenezi. Jeho zvýšenou hladinu můžeme pozorovat u patologických stavů jako jsou např. kardiovaskulární a metabolické onemocnění. (Schoonderwoerd *et al*., 2020)

4.3.1 Exprese endoglinu

Endoglin je v největší míře exprimován na povrchu endotelových buněk (obr. 4). Dále je přítomen v aktivovaných monocytech/makrofázích, buňkách hladkého cévního svalu a mezenchymálních buňkách, jako jsou například fibroblasty. Hojně je také sekretován v neovaskulární tkáni, která se tvoří v hypoxických podmínkách, jako jsou například ischemické tkáně nebo nádory. V největším měřítku se objevuje v nově vytvořených cévách HCC, kde podporuje angiogenezi a slouží pro diagnostiku. Exprese endoglinu je nezbytná pro správný vývoj srdečních chlopní, a proto se tento glykoprotein hojně vyskytuje v endokardiu. (Sánchez-Elsner *et al*., 2002; Jeng *et al*., 2021)

Gen pro endoglin je umístěn na devátém chromozomu v jádře. Jeho mutace vedou ke vzniku dědičné hemoragické telangiektázie prvního typu, což je cévní onemocnění. Jedna z podskupin lidských hematopoetických buněk (CD34), nacházející se v periferním řečišti, exprimuje antigen proti endoglinu. Jejich hematopoetický potenciál je udržován pomocí cytokinů, mezi které zařazujeme erytropoetin, IL-15, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a další. (Schoonderwoerd *et al*., 2020) Pokud dojde k pozitivní modulaci antigenů CD105 a CD34, potom endogenní TGF-β slouží k tomu, aby udržel nezralost buněk. (Pierelli *et al.,* 2001; Jeng *et al*., 2021)

Obrázek 4. Exprese endoglinu

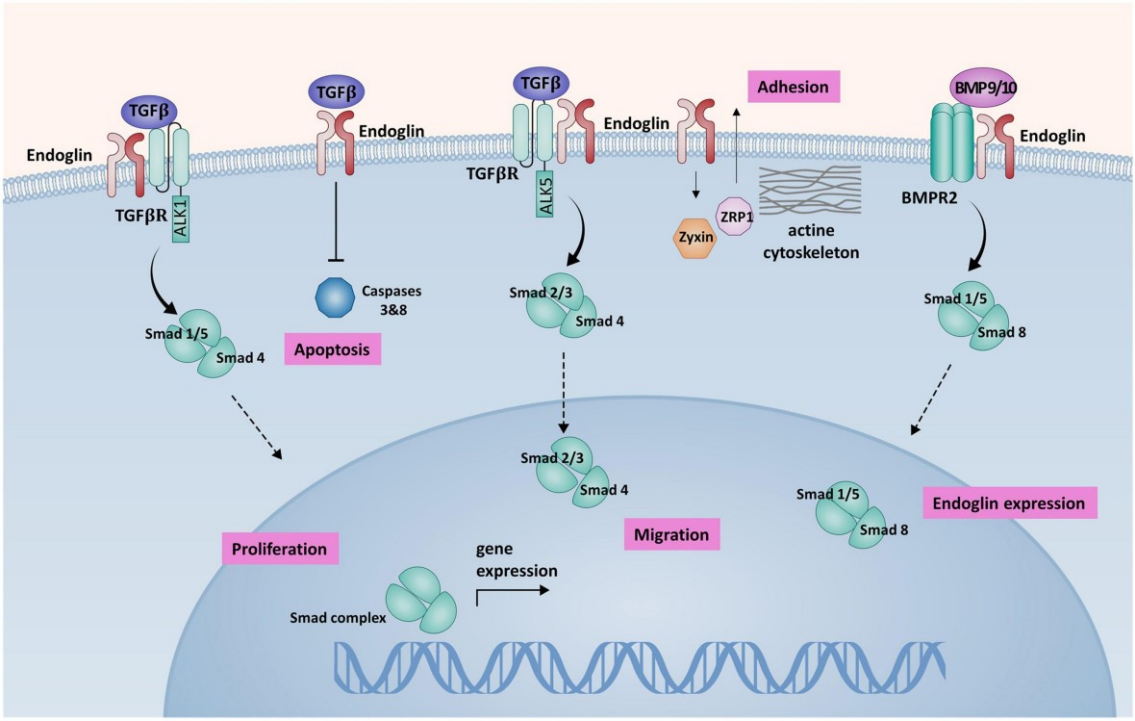


Schéma signalizace endoglinu, zprostředkované v endotelových buňkách (EC). (Vlevo) Endoglin se spojuje s TGF-β RII a ALK1 a tvoří se komplex, který má schopnost vázat TGF-β1. Aktivace komplexu vede k fosforylaci SMAD 1/5 a tvoří se komplex se SMAD 4. Komplex jde do jádra, kde reguluje expresi. Aktivace komplexu ALK5/TGF-β II vede k fosforylaci dráhy SMAD 2/3. Endoglin podporuje signalizaci BMP 9/10 pomoci BMPR 2 receptoru. Aktivace vede k fosforylaci SMAD 1/5 a následně se zvyšuje exprese endoglinu. Vazbou TGF-β na endoglin inhibujeme apoptózu, pomocí inhibice kaspáz 3 a 8. Endoglin interaguje i se ZRP-1 a zyxinem, kdy indukuje reorganizaci skeletu aktinu a má vliv na buněčnou adhezi. (Litwiniuk-Kosmala *et al.,* 2023)

4.3.2 Struktura endoglinu

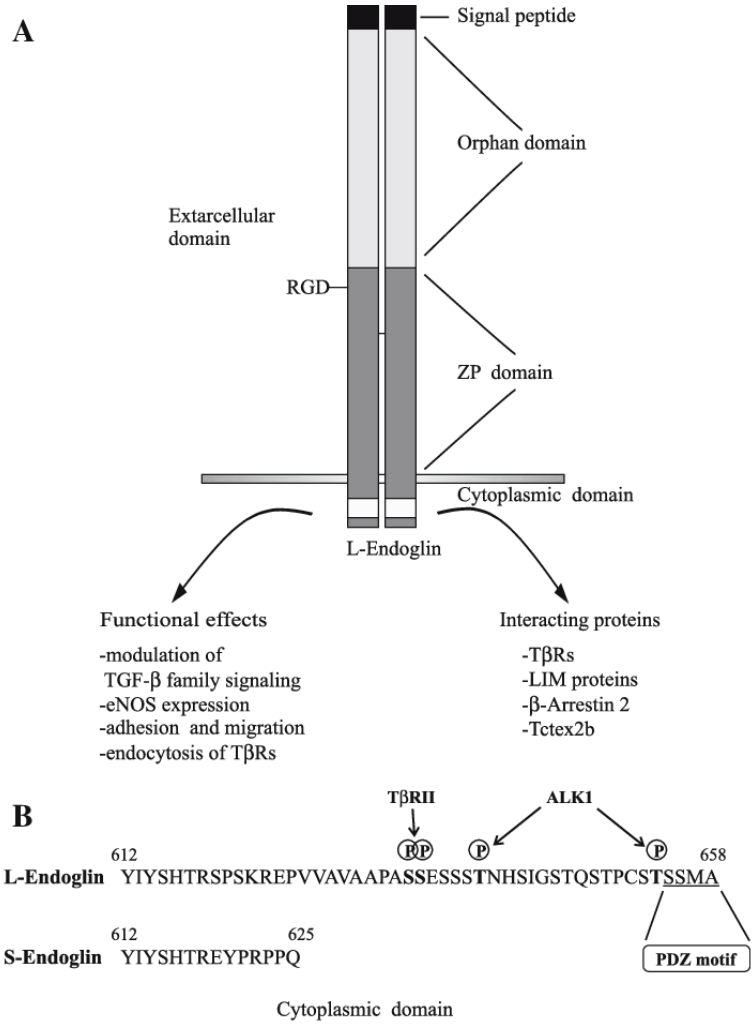
Endoglin (obr. 5) se skládá ze dvou podjednotek spojených disulfidovou vazbou. (Gougos, Letarte, 1988) Obsahuje extracelulární doménu, hydrofobní transmembránovou část a intracelulární doménu. Extracelulární část endoglinu obsahuje osiřelou doménu (ORPHAN) a část zóna pellucida (ZP), která je zodpovědná za interakci protein-protein. Část domény ZP tvoří arginin-glycin-asparagová kyselina (RGD), která je základní rozpoznávací struktura pro vazbu na integriny. N-terminální signální peptid je odpovědný za translokaci do endoplazmatického retikula. (Gougos, Letarte, 1990)

Intracelulární cytoplazmatická doména má schopnost aktivovat cytosolické proteiny. Tato oblast obsahuje serin/threoninové zbytky, které mohou podléhat fosforylaci. (Ruiz-Llorente *et al*., 2021) Celý endoglin můžeme rozdělit na dvě formy, které se liší právě cytoplazmatickou doménou, respektive počtem aminokyselin v cytoplazmatické doméně a afinitou k receptorům. Mezi tyto dvě formy patří L (dlouhá) a S (krátká). L-forma obsahuje cytoplazmatický řetězec složený ze 47 aminokyselin a stimuluje endotelové buňky k migraci, proliferaci a angiogenezi prostřednictvím dráhy kinázy podobné receptoru pro aktivin (ALK) 1/SMAD 1/5. S-forma se vyskytuje méně často, má cytoplazmatický řetězec složený ze 14 aminokyselin a nejspíše inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk a také indukuje jejich stárnutí prostřednictvím dráhy ALK5/SMAD 2/3. (Blanco *et al.,* 2008)

Kromě membránového endoglinu byla popsána i solubilní forma této molekuly, která byla nalezena ve vzorcích séra, plazmy a moči pacientů s různými onemocněními, jako je preeklampsie, ateroskleróza a rakovina. (Oujo *et al*., 2013)

Solubilní endoglin vzniká proteolytickým štěpením membránového endoglinu prostřednictvím působení metaloproteináz (MMP). Hlavním enzymem zprostředkujícím uvolnění endoglinu je matrixová metaloproteináza 14 (MMP-14), která hydrolyzuje peptidovou vazbu glycin-leucin na místě 586 endoglinu, blízko jeho transmembránové domény, a tím uvolňuje jeho extracelulární doménu do oběhu jako solubilní formu endoglinu. (Gregory *et al*., 2014)

Obrázek 5. Struktura endoglinu



Tento obrázek znázorňuje doménovou strukturu endoglinu. (A) Endoglin je disulfidicky vázaný dimerní protein, skládající se z extracelulární domény, transmembránové domény a intracelulární domény. Extracelulární doména je tvořena signálním peptidem, osiřelou (ORPHAN) doménou a ZP (zona pellucida) doménou. RGD je kyselina arginin-glycin-asparagová, která tvoří vazebný motiv. Jsou zde uvedeny interakční partneři a regulační účinky. eNOS je endotelová NO syntháza. TBRs jsou receptory, vážící se na molekuly spojené s patogeny. (B) V této části obrázku vidíme dvě formy endoglinu a těmi jsou dlouhá (L) a krátká (S). Liší se intracelulárními oblastmi, které jsou bohaté na threoninové a serinové zbytky. Ty mohou být fosforylovány TGF-βR II (Transforming Growth Factor β Receptor Type II), ALK1. Na C-konci L-endoglinu je interkalovaný motiv PDZ. (Ten Dijke *et al*., 2008)

4.3.3 Signální dráha endoglinu

Signální dráha endoglinu je komplexní a zahrnuje interakce jak na buněčné membráně, tak v rámci vnitro buněčné signalizace. Na buněčné membráně se endoglin podílí na vazbě ligandu na receptory, prezentaci ligandu receptorům, modulaci signalizačních procesů a na tvorbě homodimerů a heterodimerů. Endoglin se podílí na modulaci signální dráhy TGF-β a je místem vazby ligandů TGF-β1, TGF-β3, InhA (inhibin A), kostní morfogenetický protein 9 (BMP-9). Ligandy jsou tvořeny dvěma monomery růstového faktoru, obsahující cystinový uzel spojený disulfidickým můstkem. Receptory, vázající ligand můžeme rozdělit na několik typů. Receptory prvního typu jsou známé jako ALK receptory (activin receptor-like kinase) zahrnující ALK 1, ALK 5. Receptory druhého typu mají afinitu ke BMP ligandům a patří sem i receptor kostního morfogenetického proteinu typu II (BMPR 2) a poslední jsou receptory třetího typu, kam patří i endoglin. Navázáním ligandu se tvoří heterotetramerový komplex, díky kterému dochází k fosforylaci kináz a receptor se stává aktivní. Dimerizace komplexů může ovlivňovat jak afinitu k ligandům, tak aktivaci signálních drah. (Kim *et al.,* 2019)

Vnitrobuněčná dráha zahrnuje signalizaci SMAD, mitogen-aktivované proteinkinázy (MAPK) nebo jiné dráhy. Aktivace receptoru následně aktivuje signální dráhu přes SMAD. Komplexy, tvořené SMAD 4-SMAD 2/3 a SMAD 4-SMAD 1/5/8 jsou přesunuty do jádra, kde dochází k ovlivnění transkripce cílových genů. MAPK dráha je složena z komponent zahrnujících RAS, RAF, MEK a ERK kinázy. Díky této enzymatické aktivitě mohou jednotlivé komponenty fosforylovat mnoho buněčných cílů. Signalizace MAPK je stimulována epidermálním růstovým faktorem (EGFR), FGF, destičkovým růstovým faktorem (PDGFR) a VEGF. Signalizace vyplývá ze stimulace receptoru, aktivujícího GTPázu a RAS, vedoucí ke kaskádě reakcí. (Paton *et al*., 2020) Signalizace MAPK je regulační dráha, která hraje roli především v procesu proliferace a diferenciace. (Kim *et al.,* 2019)

Jak již bylo zmíněno, jednou z hlavních signálních drah, na které se podílí, je TGF-β dráha. TGF-β rodina je jedna z významných signalizačních rodin, skládajících se z několika receptorů serin/threonin kinázové aktivity. Obsahuje 33 ligandů TGF-β a několik receptorů. Buněčné signální proteiny TGF-β regulují embryonální vývoj, buněčný růst a metabolismus. (Kim *et al*., 2019) Endoglin hraje důležitou roli v receptorového komplexu TGF-β1, obsahující dimery ALK 5, ALK 1. Jejich receptory váží ligandy, jako jsou například TGF-β nebo BMP-9. Aktivace ALK vede k další kaskádě aktivace SMAD 1/5/8 nebo SMAD 2/3, tudíž dochází k transkripci určitých cílových genů. Pro aktivaci ALK 1/SMAD 1/5 je typický L-endoglinový konec. L-endoglin podporuje signalizaci přes ALK 1 a S-endoglin přes ALK 5. S-konec naopak

aktivuje ALK 5/SMAD 2/3 dráhu. (Finnson, Philip, 2012) S-endoglin se podílí spolu s adhezní molekulou (ICAM-2) na snížení oxidu dusnatého (NO), související s hypertenzí. Funkci proteinu reguluje endotelová NO-synthasa (eNOS). (Meurer, Weiskirchen, 2020) Má nepostradatelnou roli převážně v procesu angiogeneze. (Jeng *et al.,* 2021)

4.3.3.1 Endoglin v ovlivnění jaterní fibrózy

Fibrotizace doprovází většinu jaterních onemocnění. Klíčovou roli v tomto procesu hraje TGF-β signalizační dráha. TGF-β je profibrotický cytokin. Proces fibrózy je charakteristický akumulací vybraných složek ECM. Mezi tyto složky zařadíme například kolagen I, III a fibrinonektin. S tímto procesem souvisí narůstání fibroblastů a zároveň jejich přeměna na myofibroblasty. Modifikace na myofibroblasty je spojena s expresí α-aktinu hladkého svalstva (αSMA). (Maring *et al.,* 2012)

Endoglin je upregulován v endotelových buňkách a fibroblastech. Mění rovnováhu signalizace TGF-β pomocí ALK1-SMAD 1/5 a ALK5-SMAD 2/3 signalizačních drah a zároveň zesiluje profibrotické účinky TGF-β, což vede k nadměrné expresi ECM. Při poškození jater je exprese endoglinu nadměrně zvýšena. Toto zvýšení je úzce spjato s přeměnou HSC buněk na myofibroblasty. Endoglin zároveň fosforyluje TGF-β II receptor a dochází ke zvýšení SMAD 1/5 a expresi αSMA. (Gerrits *et al*., 2023; Finnson, Philip, 2012) Signální dráha TGF-β/endoglin/ALK/SMADs tedy hraje roli jak v procesu migrace a proliferace, tak v procesu syntézy ECM a angiogeneze. Díky tomu je endoglin důležitou molekulou v procesu fibrotizace. (Lebrin *et al*., 2004; Huang *et al.,* 2022)

Endoglin ovlivňuje tvorbu jizvové tkáně a zvyšuje hustotu mikrocév v regeneračních uzlech. Reguluje tvorbu nových cév v játrech, a to jak ve fyziologických, tak i v patologických stavech. Díky jeho nadměrným hladinám můžeme pomoci diagnostikovat nádorová onemocnění a je tak markerem buněčné proliferace. Významně se podílí na migraci a aktivaci imunitních buněk v reakci na zánět. (Meurer *et al.,* 2014)

4.4 Carotuximab (TRC105)

4.4.1 Charakteristika

Carotuximab (TRC105) je monoklonální chimérická protilátka imunoglobulin G1 (IgG1) s vysokou afinitou k endoglinu. (Tripska *et al.,* 2022) Vazbou protilátky dochází k inhibici funkce endoglinu. TRC105 inhibuje TGF-β signální dráhu, čímž vede k inhibici proteinů SMAD2/3. (Brossa *et al.,* 2018) Díky tomu dochází k inhibici angiogeneze a zabránění novotvorbě krevních cév. (Hahn *et al*., 2019) TRC105 tak může indukovat cytotoxicitu závislou na protilátkách a vést k destrukci endoglin exprimujících nádorových buněk. (Rosen *et al*., 2012)

Dnes je hojně zkoumaná na léčbu glioblastomu (GBM). Glioblastom je letální mozkový nádor, který se léčí pomocí TRC105 v kombinaci s bevacuzimabem. TRC105 v této kombinaci zvyšuje účinnost bevacizumabu. TRC105 se užívá převážně u pacientů, kteří nereagují na chemoterapii a radioterapii, nebo dokonce nereagují na samotný bevacizumab. (Rosen *et al*., 2012) Antiangiogenní terapie je důležitá v omezení expanze nádorů. Na látky inhibující VEGF může často vznikat rezistence. Kombinací TRC105 s antiangiogenními léky tedy přináší synergický účinek a snižuje riziko vzniku rezistence. Kombinací dochází ke snižování proliferace kmenových rakovinotvorných buněk. Kromě glioblastomu se zkoumá kombinace TRC105 a sorafenibu u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a kombinace TRC105 a axitinibu na léčbu renálního karcinomu. (Galanis *et al*., 2022)

4.4.2 Carotuximab a BMP-9

BMP-9 je členem rodiny TGF-β a jeho signální cesta je silně spojena s endoglinem, protože BMP-9 se váže na komplex receptorů, který zahrnuje endoglin a ALK1. TRC105 má schopnost zabránit vazbě BMP na endoglin a tím indukovat fosforylaci SMAD u endotelových buněk. Endoglin tvoří komplex s ligandem BMP-9 pomocí interakce se sirotčí doménou. TRC105 pak soutěží s BMP-9 o vazbu na receptor. (Liu *et al*., 2021)

4.5 PCR reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je reakce, při které dochází k amplifikaci specifické části DNA. Díky tomu se může z malého množství DNA tvořit mnoho kopií. Této techniky se hojně využívá v diagnostice infekcí, genetických poruch nebo rakoviny, forenzní analýze nebo biologickém výzkumu pro klonování genů. Mezi výhody metody PCR patří vysoká citlivost, specifičnost, rychlost a reprodukovatelnost. Mezi nevýhody se naopak řadí náchylnost ke kontaminaci, ekonomické dopady nebo možnost lidské chyby, která vede k nesprávným výsledkům. Za tvůrce PCR se považuje Kary B. Mullis, který získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. (National Human Genome Research Institute, 2020)

4.5.1 Princip PCR reakce

Prvním krokem reakce PCR je denaturace, kdy se dvouvláknová DNA zahřeje na vysokou teplotu (95 °C). Dojde tak k rozrušení vazeb mezi bázemi a oddělí se dvě samostatná vlákna. Druhý krok se nazývá annealing a spočívá ve snížení teploty na 50-65 °C. V tomto teplotním rozsahu jsou primery schopné komplementace v cílové oblasti a váží se na oddělená vlákna DNA. Třetím krokem je elongace pomocí DNA polymerázy. Enzym DNA polymeráza má katalyckou aktivitu a váže se na primery. Následně dochází k syntéze nového komplementárního řetězce DNA vůči matricovému vláknu. Čtvrtým krokem je cyklování. V tomto kroku dochází k repetici minulých kroků až 40x. Díky tomu dochází k exponenciální amplifikaci oblasti DNA. (National Human Genome Research Institute, 2020)

4.6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry) je technika, používaná v detekci a měření fyzikálních a chemických vlastností populace buněk. Používá se například pro imunofenotypizaci nebo na analýzu buněčných cyklů, detekci apoptózy nebo analýzu toku vápenatých iontů. Mezi její výhody patří rychlost, přesnost, citlivost a schopnost měřit více buněk najednou. Nevýhody jsou například složitost obsluhy přístroje, odbornost a ekonomické aspekty. (McKinnon, 2018, -1)

4.6.1 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie má několik aplikací jako je imunofenotypizace, analýza buněčného cyklu, detekce apoptózy nebo analýza toku vápníku. Imunofenotypizace zahrnuje identifikaci a počítání různých typů imunitních buněk ve vzorku. Využívá se především k diagnostice onemocnění imunitního systému. Další využití má průtoková cytometrie v oblasti analýzy buněčných cyklů. Měří obsah DNA v buňkách, a tím pádem dokáže stanovit, v jaké fázi buněčného cyklu se nachází. Toho využíváme například pro identifikaci stádia proliferace rakovinových buněk. Využití nachází i v oblasti detekce apoptózy a analýzy toku vápníku. Měří změny v intracelulární koncentraci vápníku, které se spojují s buněčnými procesy. (McKinnon, 2018, -2; Chelkar, Panda, 2020)

4.6.2 Instrumentace

Průtokové cytometry se skládají ze systémů fluidiky, optiky a elektroniky. Fluidní systém je tvořený kapalinou v pufrovaném fyziologickém roztoku, která je pod neustálým tlakem. Jejím úkolem je zaostřit a dodat vzorek na analyzátor. Optický systém zahrnuje lasery a fotonásobiče, které generují světelný signál. Nejvíce používané lasery jsou například 488 nm (modrý), 405 nm (fialový), 532 nm (zelený), 552 nm, 561 nm (žlutý), 640 nm (červený) nebo 355 nm (ultrafialový). Systém dále obsahuje dva druhy filtrů. Dichroické filtry mají schopnost propouštět světlo o krátké vlnové délce a zbylé odrážejí pod určitým úhlem. Pásmové filtry mají malé rozpětí vlnových délek v toleranci ± 25 nm od určené hodnoty. Elektronický systém je důležitý pro převod signálu z detektoru do digitální podoby. (McKinnon, 2018, -2)

5. ZADÁNÍ- CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit, zda je carotuximab (TRC105) schopný snížit expresi endoglinu a tím zamezit rozvoji, nebo omezit progresi jaterní fibrózy v lidských jaterních hvězdicovitých buňkách neboli hepatic stellate cells (HSC).

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Chemikálie

Tab. 1. Chemikálie

Stellate Cell Medium	ScienceCell Research Laboratories
Poly-L-lysin	ScienCell Research Laboratories
TGFβ	R&D Systems
TRC105	Tracon Pharmaceuticals
Isopropyl alkohol	Lach:ner
Chloroform	Penta chemicals
75% ethanol	Lach:ner
TriReagent™	Invitrogen/ThermoFisher
GenElute™ LPA	Sigma Aldrich
Primers for PCR	ThermoFisher Scientific
Master mix pro reverzní transkripci	Reverse transcription High capacity cDna RT kit, ThermoFisher Scientific
PCR Master mix	TaqMann® Fast Universal PCR master mix, ThermoFisher Scientific
akutáza	Invitrogen/ThermoFisher
PBS	Sigma Aldrich
FBS	Biosera

6.2 HSC buňky

K pokusu jsme použili HSC buňky-hepatic stellate cells. Buňky jsme získali od společnosti ScienCell Research Laboratiries. Buňky jsou izolovány přímo z lidských jater a jsou dodávány kryokonzervované. Lahvička obsahuje více jak $5x10^5$ buněk v 1 ml. Pro kultivaci v *in vitro* podmínkách jsme využili médium Stellate Cell Medium (ScienCell Research Laboratories) obohacené o 2% FBS. Po dosažení 70-90% konfluence byly buňky pasážovány. Kultivační nádoby byly potažené Poly-L-lysinem (ScienCell Research Laboratories) dle doporučení výrobce. Buňky byly uchovávané v inkubátoru při 37 °C a 5 % atmosféry oxidu uhličitého.

6.3 Design pokusu

Pro vlastní měření jsme používali buňky v pasáži č.3. Po nasazení do 6-ti jamkových kultivačních misek a dosažení 90% konfluence jsme je rozdělili na 3 skupiny – kontrolní skupina, TGF-β skupina a TGF-β + TRC105 skupina. TGF-β (Recombinant Human TGF-β 1 Protein, R&D Systems, GB) je použit jako nejvíce potentní induktor fibrózy a TRC105 (TRACON Pharmaceuticals Inc.) je protilátka použitá k blokaci endoglinu.

Pro měření hladiny mRNA endoglinu, kolagenu I a αSMA jsme zvolili metodu PCR. Kontrolní skupinu jsme ovlivnili po dobu 24 hodin médiem bez FBS, TGF-β skupinu jsme ovlivnili po dobu 24 hodin pomocí TGF-β v koncentraci 5 ŋg/ml rozpuštěného v médiu bez FBS. TGF-β s TRC105 skupinu jsme podrobili 3 hodinové inkubaci v médiu. Po přidání TRC105 v koncentraci 300 μg/ml jsme následovně ovlivnili po dobu 24 hodin pomocí kombinace TGF-β v koncentraci 5 ng/ml a TRC105 v koncentraci 300 μg/ml. Obě látky jsme přidávali do média bez FBS.

Pro stanovení hladiny proteinu pSMAD 2/3 jsme zvolili metodu průtokové cytometrie. Kontrolní skupinu jsme ovlivnili po dobu 30 minut médiem bez FBS, TGF-β skupinu jsme ovlivnili po dobu 30 minut pomocí TGF-β v koncentraci 5 ng/ml rozpuštěného v médiu bez FBS. TGF-β s TRC105 skupinu jsme podrobili 3 hodinové inkubaci v médiu. Po přidání TRC105 v koncentraci 300 μg/ml jsme následně ovlivnili po dobu 30 minut pomocí kombinace TGF-β v koncentraci 5 ng/ml a TRC105 v koncentraci 300 μg/ml. Obě látky jsme přidali do média bez FBS. Časy působení a koncentrace jednotlivých látek vycházejí z předchozích pokusů. Počet vzorků ve skupině byl 6 pro PCR měření a 4 pro měření pomocí průtokové cytometrie.

6.4 qRT-PCR

6.4.1 Příprava před experimentem

Den před začátkem experimentu jsme si dali isopropyl alkohol, chloroform a 75% ethanolu do mrazáku (-20 °C). Poté jsme si 20 minut před samotným experimentem vzali TriReagent™ z lednice a nechali při pokojové teplotě. TriReagent™ slouží k separaci RNA, DNA z proteinů a obsahuje fenol, guanidin thiokyanát a chloroform. Ve stejný čas, tedy 20 minut před experimentem jsme si dali PBS do vodní lázně, zahřáté na 37 °C. Řádně jsme si připravili a popsali PCR clean zkumavky a zapnuli centrifugu, kterou jsme si vytemperovali na teplotu 4 °C.

6.4.2 Zpracování vzorků

Do 6-ti jamkové destičky, kterou jsme si opláchli pomocí PBS jsme přidali 1ml TriReagent™ , který jsme přidali především z důvodu, aby došlo k lyzaci buněk a dostali jsme se ke genetické informaci. TriReagent™ jsme nechali působit po dobu 5 minut. Během této doby jsme vzorky opatrně promíchávali. Poté jsme přemístili celý objem v jamce do předem připravených a popsaných zkumavek.

6.4.3 Izolace RNA

Během procesu izolace RNA využíváme vždy PCR clean materiál. V prvním kroku jsme provedli homogenizaci vzorků, která je důležitá především k rozvolnění mRNA. Po homogenizaci jsme přidali 200 μL (na 1ml původně použitého TriReagentu) studeného chloroformu ke každému vzorku. Všechny vzorky jsme důkladně promísili pomocí vortexu po dobu 10 sekund. Vzorky jsme poté nechali 10 minut stát při pokojové teplotě. V dalším kroku jsme vzorky stočili pomocí centrifugy při 4 °C a 12 000 rpm po dobu 15 minut. Po stočení se nám oddělily jednotlivé vrstvy. Uprostřed se nám oddělil prstenec DNA. Nad prstencem se pak nacházela vodná fáze RNA.

Přenesli jsem si celý objem vodné fáze do nových zkumavek, obsahujících 5 μL GenElute™-LPA (56575-1ML, Merck, Německo), které se přidává hlavně z důvodu většího výtěžku reakce. Při přenosu jsme dávali pozor, aby se do nových vzorků nedostala vrstva, obsahující TriReagent™. Ke vzorkům jsme přidali 500 μL (na 1 ml původně použitého TriReagentu) studeného isopropyl alkoholu a promíchali pomocí vortexu po dobu 10 sekund. Po promíchání se objevila sraženina RNA. Vzorky jsme nechali stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby jsme vzorky opět stočili při 4 °C, 12 000 rpm po dobu 10

minut. V dalším kroku jsme odsáli isopropyl alkohol. Na dně nám zůstala pouze vysrážená RNA z buněk tzv. peletka. Nakonec jsme přidali 1 000 μL (na 1 ml původně použitého TriReagentu) studeného 75% ethanolu ke každému vzorku a 10 sekund promíchali pomocí vortexu.

6.4.4 Měření koncentrace RNA

V prvním bodě je potřeba odstranit 75% ethanol a vysušit vzorky až na samotné peletky. Peletky začaly postupně blednout, až se staly transparentní. Jakmile začaly být transparentní, přidali jsme 15 μL vody pro injekci (API) a nechali v lednici po dobu 20 minut rozpustit. V mezičase jsme si zapli Nano drop (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH, Německo). Vybrali si program RNA, ředící faktor na 1000, lid faktor 40, koncentraci v jednotkách ng/μL. Dávkovali jsme 1,5 μL API na optický povrch, zakryli a zmáčkli „blank". Optický prostor jsme očistili pomocí celulosového čtverce a následně změřili koncentrace mRNA v μg/μL u každého vzorku. Výsledná koncentrace měla být u každého vzorku v rozmezí okolo 200 – 1 000 ng/μL. Jestliže byla koncentrace větší, byla potřeba vzorky naředit.

6.4.5 Transkripce z RNA do cDNA

Naředili jsme všechny vzorky na 100 ng/mL podle ředící řady, kterou jsme si vytvořili měřením vzorků. Připravili jsme si master mix na reverzní transkripci (Tab. 2. Master mix pro reverzní transkripci) (High capacity cDNA reverse transcription kit, ThermoFisher Scientific). Ke každému vzorku jsme přidali 10 uL připraveného master mixu a zapli si termocycler (Biometr TOne 96G, Analytik Jena, Německo). Vzorky jsme si před uložením do termocycleru stočili pomocí centrifugy po dobu 5-10 sekund. Po stočení jsme vzorky umístili do thermocycleru. Umístění vzorků by nemělo zasahovat do stran. Snažili jsme se co nejvíce obsadit místa uprostřed podložky thermocycleru a vzorky jsme umístili stejným směrem. Po uložení vzorků do podložky jsme zapli program. Po dokončení programu jsme přidali 180 μL API ke každému vzorku. Koncentrace vzorků byla v tomto bodě 5 ng/μL.

6.4.6 Příprava do 96-ti jamkové destičky

Použili jsme master mix pro PCR (TagMan® Fast Universal PCR Master Mix, ThermoFisher Scientific) s odpovídajícími primery (*Tab. 3. Primery pro RT-PCR ThermoFisher Scientific*), a také housekeep gen, který není ovlivněn zvoleným treatmentem a slouží jako vnitřní kontrola. Pipetovali jsme 5,5 μL této směsi do 96-ti jamkové destičky. Destičku jsme zakryli pomocí adhezivní folie. Poté jsme desku stočili pomocí centrifugy po dobu 2 minut na

1 000 rpm. Měření PCR probíhalo v PCR Cycleru (QuantStudio$_{TM}$ Flex Real-Time PCR Systém, Applied Biosystems, USA) pomocí programu QuantStudio).

Tab. 2. Master mix pro reverzní transkripci

MM RT	11 samples	množství	nadb.	samp. (µL)
1	nuclease free water	4,2	4,536	68,04
2	RT buffer	2	2,16	32,4
3	RT random primers	2	2,16	32,4
4	dNTP mix	0,8	0,864	12,96
5	reverse transkriptase	1	1,08	16,2

Tab. 3. Primery pro RT-PCR ThermoFisher Scientific

Gen	Protein	Katalogové číslo
ENG	Endoglin	Hs00923996_m1
COL1A1	Kolagen I	Hs00164004_m1
ACTA2	Aktin alfa 2	Hs00426835_m1
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	Hs02786624_g1

Tab. 4. Rozložení vzorků na destičce pro PCR

Templ.													
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	GAPDH
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
D	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ENG
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	21	
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Templ.													
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	COL1A1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
D	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ACTA2
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	21	
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	

6.5 Intracelulární průtoková cytometrie p-SMAD

Před samotným experimentem jsme si připravili reagencie pro pokus, zahřáli jsme médium pro buňky, PBS, akutázu a 2% FBS v PBS ve vodní lázni na 37 °C.

Buňky ve 12-ti jamkových deskách jsme si promyli pomocí PBS (Promytí jsme opakovali celkově dvakrát). Po promytí jsme přidali 125 µL akutázy a dali na 5 minut do inkubátoru. Po inkubaci jsme přidali 125 µL FBS s PBS a celý objem jamky přenesli do 96-ti jamkové destičky s tvarem jamek V. Destičku jsme stočili při 300 rcf po dobu 3 minut.

Po odsátí supernantu jsme destičku resuspendovali pomocí poklepání na tvrdý povrch a přidali 200 µL 2% FBS v PBS, promytí jsme opakovali celkem 2×. Poté jsme přidali ke každému vzorku 200 µL 4% paraformaldehydu na fixaci. Všechny vzorky jsme důkladně provortexovali, aby nedocházelo ke shlukování buněk a fixace probíhala správně. Dále jsme celou destičku stočili při 300 rcf po dobu 3 minut a vzorky 2× promyli. V dalším kroku jsme přidávali ke každému vzorku 20 µL PBS a 180 µL ledového methanolu na permeabilizaci. Konečná koncentrace methanolu činila 90 %. Vzorky jsme zvortexovali a nechali inkubovat po dobu 10 minut. Po inkubaci jsme destičku stočili, supernant odsáli a vzorky opět 2× promyli.

Dále jsme přidali 50 µL primární protilátky pSMAD 2/3 (Cell Signaling Technology) při ředění 1:200 v FBS v PBS a nechali působit po dobu 1 hodiny při 4 °C. Po čas, kdy jsme nechávali působit protilátku jsme destičku několikrát vortexovali, aby nedocházelo ke shlukování buněk. Po inkubaci jsme destičku stočili, supernant odsáli a vzorky opět 2× promyli. Dále jsme pracovali ve tmě.

Přidali jsme 100 µL sekundární protilátky Alexa Fluor 488 (Invitrogen/ThermoFisher) v 2% FBS v PBS v ředění 1:300 a nechali působit při teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Touto dobou jsme destičku občasně vortexovali, aby nedocházelo ke shlukování buněk. Po inkubaci jsme destičku opět stočili, supernant odsáli a vzorky 2× promyli. V dalším kroku jsme vzorky resuspendovali v 150 µL PBS a změřili pomocí cytometru (CytoFlex LX, Beckman Coulter, Kalifornie, USA) a výsledky jsme vyhodnotili v programu (CytExpert Acquisition and Analysis Software verze 2.4, Beckman, Kalifornie, USA)

6.6 Statistická analýza

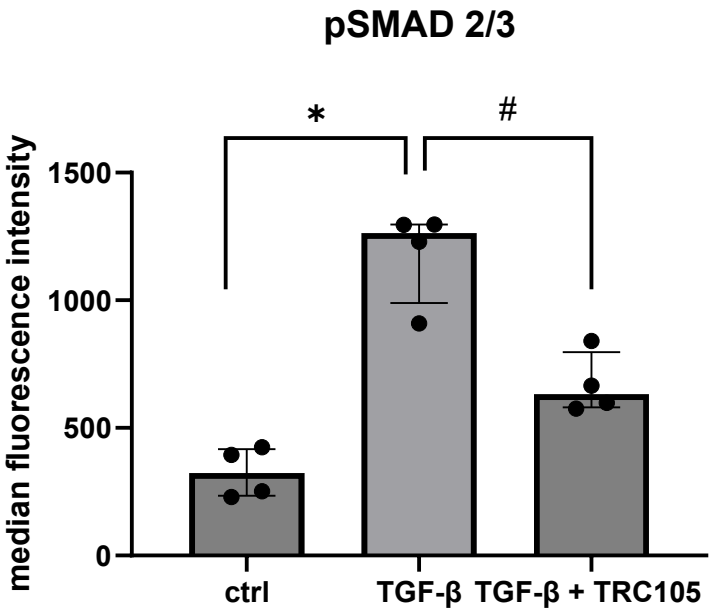
K analýze dat jsme použili software GraphPad Prism 9.2, konkrétně neparametrický Mann-Whitney test (GraphPad Software INC., San Diego, CA, USA). Výsledky jsme zpracovali na základě průměru ± SEM (střední chyba průměru). Statisticky významnou hodnotu považujeme takovou, kde $p \leq 0{,}05$.

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1.1 Stanovení hladiny pSMAD 2/3

Stanovení hladiny pSMAD2/3 jsme provedli pomocí metody průtokové cytometrie. Hladina fluorescence v kontrolní skupině (ctrl) nám slouží jako referenční hodnota. Ve skupině TGF-β je hladina výrazně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou, což naznačuje aktivaci SMAD signální dráhy prostřednictvím TGF-β. Tento nárůst je statisticky signifikantní (*) = ($p \leq 0,05$). Skupina TGF-β v kombinaci s TRC105 má hladinu nižší než skupina TGF-β, což ukazuje na inhibiční účinek TRC105.

Graf 1. Průtoková cytometrie pSMAD 2/3



*Graf znázorňuje míru ovlivnění pSMAD 2/3 v kontrolní skupině (ctrl), ve skupině TGF-β a ve skupině TGF-β v kombinaci s TRC105 (TGF-β+TRC105). Osa x znázorňuje skupiny, osa y znázorňuje nárůst pSMAD 2/3. Výsledky jsou vyjádřené v intenzitě fluorescence, n=4, Mann-Whitney test, přičemž platí že *, # $p \leq 0.05$*

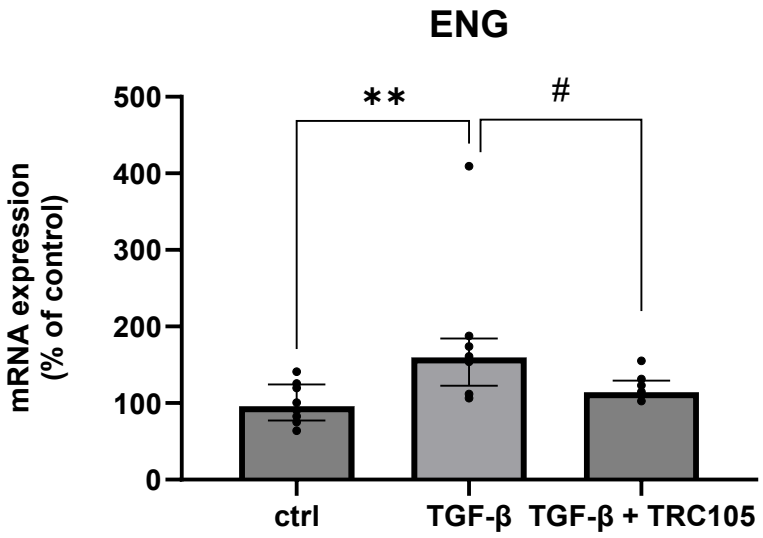
Výsledky ukazují vliv TRC105 na signální dráhu TGF-β/SMAD 2/3 v jaterních hvězdicovitých buňkách (HSC). Nejprve došlo k indukci jaterní fibrózy pomocí TGF-β. TGF-β je silně profibrotický a podílí se na aktivaci HSC buněk. Ve skupině TGF-β je signifikantně zvýšená hladina pSMAD2/3 v porovnání s kontrolní skupinou, což je v souladu s již existujícími studiemi, jako je například Lebrina *et al*. (2004), kde je podrobně rozebrána role TGF-β ve vaskulární biologii a vysvětleno, jak aktivace TGF-β může vést k nadměrné produkci ECM. Studie pracuje s myšími embryonálními buňkami. Experiment ukazuje, že se zvyšujícím se TGF-β dochází ke zvýšené aktivaci SMAD signální dráhy, což je spojováno s rozvojem jaterní fibrózy. Tento jev byl dále potvrzen již existující studií Dewidar *et al*. (2019), prokazující, že TGF-β aktivuje HSC buňky a podporuje tak rozvoj jaterní fibrózy.

Implementace TRC105 vedla ke snížení aktivace TGF-β/SMAD2/3 kaskády, což potvrzuje vliv protilátky na uvedenou signální dráhu. Tato zjištění můžeme dále potvrdit studií Tripska *et al*. (2022) provedenou na lidských aortálních endotelových buňkách, ukazující, že TRC105 moduluje SMAD signalizaci. Výsledky dále ukazují, že inhibicí pomocí TRC105 se snižuje fosforylace SMAD2/3 a narušuje se TGF-β/SMAD signalizační dráha, což je důležité zejména v souvislosti s jinými studiemi jako je Dooleyho a Ten Dijkeho (2012), ukazující na důležitost SMAD signální dráhy k potlačení jaterní fibrózy u myších modelů.

7.1.2 Exprese hladiny mRNA endoglinu

Pro stanovení hladiny mRNA endoglinu (ENG) jsme použili metodu PCR. Výsledky znázorňují hladiny mRNA endoglinu ve třech různých skupinách. Kontrolní skupina (ctrl), kde je hladina nastavena na 100 %, slouží jako referenční. Skupina TGF-β, kde je hladina výrazně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou naznačuje zvýšenou expresi endoglinu. Tento nárůst je statisticky signifikantní. Skupina TGF-β s TRC105 je ve srovnání s TGF-β skupinou signifikantně snížena, ale stále je vyšší než v kontrolní skupině.

Graf 2. PCR-vliv na ENG



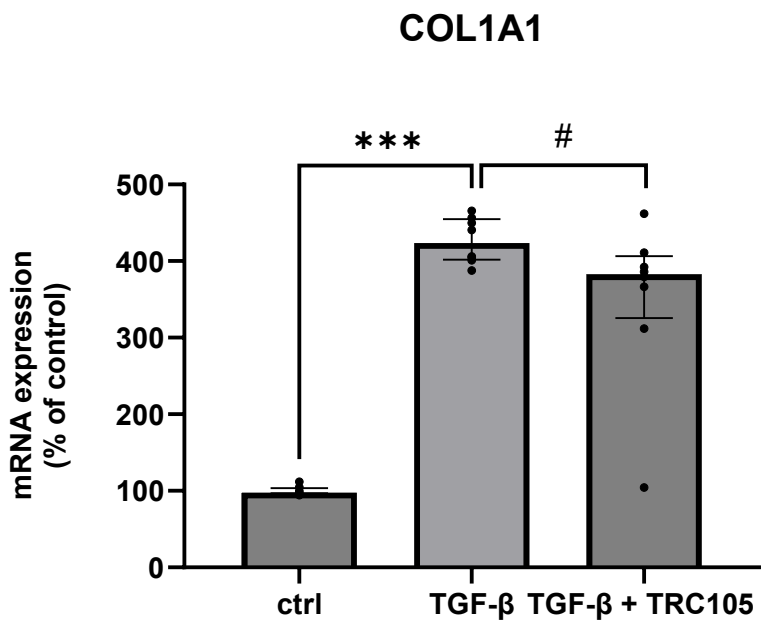
Graf znázorňuje míru exprese endoglinu (ENG) v kontrolní skupině (ctrl), ve skupině TGF-β a ve skupině TGF-β v kombinaci s TRC105 (TGF-β+TRC105). Osa x znázorňuje skupiny, osa y znázorňuje relativní hladinu ENG (%). Výsledek vyjadřujeme jako % kontroly, n=6, Mann-Whitney test, přičemž platí že $\#p \leq 0.05$, $**p < 0.01$

TGF-β zvyšuje expresi mRNA endoglinu, což naznačuje jeho roli v aktivaci endoglinu. Ovlivněním buněk pomocí TRC105 před přidáním TGF-β výrazně snižujeme endoglinovou expresi.

7.1.3 Exprese hladiny mRNA kolagenu

Pro stanovení hladiny mRNA kolagenu I (COL1A1) jsme použili metodu PCR. Výsledky znázorňují hladinu kolagenu ve třech různých skupinách. Kontrolní skupina (ctrl), kde je hladina nastavena na hodnotu 100 % slouží jako referenční bod. Skupina TGF-β (5 ng/ml), kde je hladina zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou, což naznačuje, že TGF-β zvyšuje expresi kolagenu I. Tento nárůst je statisticky signifikantní (***). Skupina TGF-β s TRC105, kde je hladina mRNA ve srovnání se skupinou TGF-β snížená, ačkoli je stále vyšší než v kontrolní skupině. Toto snížení je také statisticky signifikantní (#).

Graf 3. PCR-vliv na COL1A1



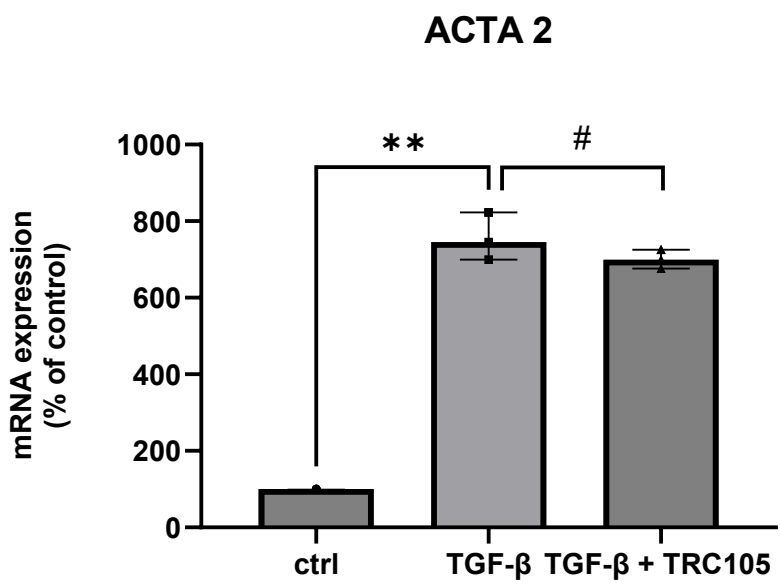
*Graf znázorňuje míru exprese kolagenu (COL1A1) v kontrolní skupině (ctrl), ve skupině TGF-β a ve skupině TGF-β v kombinaci s TRC105 (TGF-β+TRC105). Osa x znázorňuje skupiny, osa y znázorňuje relativní hladinu COL1A1 (%). Výsledky vyjadřujeme jako % kontroly, n=6, Mann-Whitney test, přičemž platí že # $p \leq 0.05$, ***$p < 0.001$*

TGF-β indukuje expresi mRNA kolagenu, což podporuje jaterní fibrotizaci. Díky TRC105 této indukci předcházíme. Tyto výsledky naznačují, že endoglin pravděpodobně hraje důležitou roli v regulaci exprese kolagenu I a tím pádem v rozvoji fibrotizace.

7.1.4 Exprese hladiny mRNA αSMA

Pro stanovení hladiny mRNA αSMA (ACTA2), jsme použili metodu PCR. Výsledky znázorňují hladinu αSMA ve třech různých skupinách. Kontrolní skupina je nastavena na hodnotu 100 % a je považována za referenční. Skupina TGF-β má hladinu exprese mRNA vyšší, což znázorňuje zvýšenou expresi αSMA, prostřednictvím TGF-β. Tato hodnota je ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky signifikantní (**). Skupina TGF-β s TRC105, je charakteristická signifikantním snížením mRNA vůči TGF-β skupině (#; $p \leq 0{,}05$).

Graf 4. PCR-vliv na ACTA2



*Graf znázorňuje míru exprese αSMA (ACTA2) v kontrolní skupině (ctrl), ve skupině TGF-β a ve skupině TGF-β v kombinaci s TRC105 (TGF-β+TRC105). Osa x znázorňuje skupiny, osa y znázorňuje relativní hladinu ACTA2 (%). Výsledky vyjadřujeme jako % kontroly, n=6, Mann-Whitney test, přičemž platí že, # $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$*

TGF-β významně zvyšuje expresi mRNA αSMA. Díky TRC105 může docházet k předcházení indukce tohoto fibrotického markeru. Tímto výsledkem můžeme potvrdit, že endoglin hraje roli v regulaci exprese tohoto markeru.

7.1.5 Diskuze endoglinu, kolagenu a αSMA

Endoglin je koreceptorem TGF-β a významným regulátorem signální kaskády TGF-β/SMAD. Nadměrná exprese endoglinu je spojována s aktivací HSC buněk během procesu jaterní fibrózy. Aktivované HSC buňky se přeměňují na myofibroblasty, a ty způsobují nadměrnou expresi ECM. Endoglin hraje roli nejen v jaterní fibróze, ale i dalších patologických stavech jako jsou například kardiovaskulární nebo onkologická onemocnění. Nejprve byla provedena indukce tohoto patologického procesu pomocí TGF-β, kdy došlo ke značnému zvýšení exprese hladiny mRNA endoglinu, kolagenu a také αSMA. Tato skutečnost podporuje tvrzení, že TGF-β významně přispívá k aktivaci HSC buněk a k indukci jaterní fibrózy. Zjištění je v souladu s již existující studií Cordero-Espinoza a Huch (2018), která pojednává o modulaci TGF-β. Studie se zabývá expresí a složkami ECM, které jsou stimulovány pomocí TGF-β a využívá primární myší HSC buňky. Ukazuje, že TGF-β je klíčovým markerem pro rozvoj jaterní fibrózy.

Kolagen I (COL1A1) je jednou ze složek ECM a má schopnost tvořit fibrotickou tkáň. Výsledky ukazují zvýšenou hladinu exprese mRNA po vystavení TGF-β v jaterních hvězdicovitých buňkách (HSC). Očekávanou zvýšenou expresi můžeme podložit studií Higashi *et al.* (2017), která ukazuje, že TGF-β indukuje expresi COL1A1 v lidských buňkách HCC. Zvyšování hladiny mRNA kolagenu je doprovázeno zvýšenou expresí endoglinu. Tuto skutečnost můžeme dále potvrdit studií Rodríguez-Barbero *et al.* (2006). V rámci této studie je kolagen zmíněn v souvislosti s regulací TGF-β prostřednictvím ERK 1/2 MAPK signální dráhy. Studie ukazuje, že endoglin hraje roli v regulaci syntézy kolagenu v odpovědi na TGF-β1, přičemž tento efekt závisí na aktivaci ERK 1/2 MAPK. Studie využívá fibroblasty a buňky s modifikovanou expresí endoglinu.

Kombinace TGF-β s TRC105 vede ke snížení hladiny mRNA kolagenu. Tento výsledek naznačuje, že TRC105 může mít inhibiční účinek na expresi tohoto markeru indukovanou TGF-β. TRC105, který je anti-endoglinovým terapeutikem, vede ke snížení aktivace HSC buněk. Díky této blokaci se HSC buňky méně přeměňují na myofibroblasty, což vede ke snížení exprese fibrogenních markerů, včetně kolagenu. Podobné účinky můžeme pozorovat i ve studii Song *et al.* (2022) o rekombinantním latency-associated peptidu (LAP), blokující TGF-β/SMAD prostřednictvím snižovaní aktivace HSC buněk a ukládání kolagenu v *in vivo* i *in vitro* modelech. Kombinace TGF-β a TRC105 vykazuje podobné anti endoglinové efekty, což se ukazuje i již existující studii Schoonderwoerd *et al.* (2021), ukazující, že TRC105 vede k inhibici endoglinu,

což následně způsobuje snížení růstu pankreatického duktálního adenokarcinomu. Studie byla prováděna na lidských, ale i myších tkáňových modelech.

αSMA (ACTA2) je fibrogenní marker, který je jednou ze složek ECM. Výsledky ukazují vliv TGF-β a TRC105 na hladinu mRNA. Nejprve došlo k indukci jaterní fibrózy pomocí TGF-β, kdy byla pozorována zvýšená exprese tohoto markeru. Zvýšená exprese αSMA po stimulaci TGF-β naznačuje remodelaci tkáně a fibrinogenezi. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou Fakatava *et al*. (2023), která podporuje hypotézu, že hladina αSMA stoupá díky ovlivnění TGF-β. Studie byla provedena na lidských parodontálních vazivových buňkách. Další relevantní studie Rockey *et al.* (2013) se zabývala aktivací HSC buněk v játrech a zjistila zvýšení exprese αSMA po indukci jaterního poškození. Zvýšení bylo spojeno s přeměnou HSC buněk na myofibroblasty. Naše výsledky můžeme ještě podpořit studií Gerrits *et al.* (2023), která zkoumala úlohu endoglinu v progresi chronického onemocnění ledvin a jeho vliv na expresi αSMA. Studie zdůrazňuje, že endoglin ovlivňuje fibrotické změny v ledvinách a αSMA je jedním z ukazatelů těchto změn. Studie zmiňuje roli endoglinu v progresi chronického onemocnění ledvin a terminálního stádia chronického onemocnění ledvin. Zvýšené hladiny endoglinu souvisely s pokročilým stádiem onemocnění a mohou složit jako biomarker pro monitoring progrese.

Zjistili jsme, že blokací endoglinu pomocí TRC105 dojde i ke snížení hladiny mRNA αSMA. Podobné výsledky nalezneme v již zmíněné studii Gerrits *et al.* (2023), která ukazuje na přítomnost mRNA αSMA v renálních vzorcích. Po přidání protilátky TRC105 došlo taktéž ke snížení hladiny mRNA.

Tyto výsledky naznačují, že blokováním endoglinu můžeme ovlivňovat aktivaci HSC buněk zprostředkovanou pomocí TGF-β. Podobné závěry můžeme pozorovat ve studii Rosen *et al.* (2014), zaměřující se na vliv inhibice endoglinu na aktivaci HSC buněk a vznik fibrózy. Studie využívá inhibici jak endoglinu, tak VEGF dráhy, což vede k lepším výsledkům, například u léčby rezistentních pacientů s nádorem.

Celkově můžeme výsledky tohoto experimentu shrnout tak, že blokování endoglinu může být účinnou strategií pro omezení aktivace HSC buněk a zabránění procesu fibrotizace. Výsledky přináší další důkazy o roli endoglinu v patogenezi jaterní fibrózy a potvrzují, že inhibice pomocí TRC105 může vést ke snížení aktivity HSC buněk a tím k omezení produkce ECM. Zároveň dokazuje, že pomocí TRC105 můžeme zmírnit expresi fibrogenního kolagenu a αSMA a tím potlačit fibrotický proces. Cílení na endoglin tedy představuje slibnou možnost pro rozvoj progresivní terapie. Podporu výsledků můžeme najít ve studii Scharpfenecker *et al.*

(2007), která zkoumá endoglin v cévním systému. Jeho inhibice může mít modulační účinky na TGF-β signalizaci. Tento závěr odpovídá našim pozorováním, že endoglin hraje roli v modulaci TGF-β.

8. ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřila na vliv exprese endoglinu na jaterní fibrózu. Soustředili jsme se především na TGF-β/SMAD2/3 signální dráhu v HSC buňkách v podmínkách *in vitro*. HSC buňky jsou klíčovými buňkami hrajícími roli v procesu vzniku jaterní fibrózy, proto jsou vhodným materiálem pro studium mechanismů fibrinogeneze.

Výsledky diplomové práce prokázaly, že po ovlivnění buněk pomocí TGF-β dochází k zvýšení hladin pSMAD2/3 a také zvýšené expresi mRNA u endoglinu, stejně jako u profibrotických markerů, mezi které patří kolagen I a αSMA. Při aplikaci anti-endoglinové protilátky TRC105 jsme pozorovali zabránění TGF-β indukované expresi u všech zmíněných markerů.

Námi získané výsledky naznačují, že endoglin by mohl hrát významnou roli v procesu jaterní fibrózy a že tato monoklonální protilátka by mohla inhibovat fibrotické procesy, která jsou spojené s aktivaci SMAD signalizační kaskády.

Nevýhodou práce stále zůstává fakt, že byl experiment vykonán pouze na jednom typu buněk. Zároveň by bylo dobré vyzkoušet účinky TRC105, jak na dalších typech buněk, tak zejména v *in vivo* podmínkách. Další nevýhodou může být naše zaměření na jednu signalizační dráhu, i přestože k aktivaci HSC buněk mohou vést i další signalizační dráhy. V dalších experimentech by tak bylo vhodné se zaměřit na jiné signální dráhy a odlišné podmínky. Příkladem může být signální dráha Wnt/β-katenin nebo Notch v *in vivo* podmínkách.

Konečným usnesením je, že TGF-β/SMAD2/3 signalizační kaskáda hraje významnou roli v procesu jaterní fibrózy a může sloužit jako terapeutický cíl pro léčbu tohoto onemocnění.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

Tab. 5. Seznam zkratek

ADH	Alcohol dehydrogenase	Enzym alkohol dehydrogenáza
αSMA	α-smooth muscle actin	α-aktin hladkého svalstva
ALK	Aktivin receptor-like kinase	Kináza podobná receptoru pro aktivin
BMP	Bone morphogenetic protein	Kostní morfogenetický protein
ECM	Extracellular matrix	Mezibuněčná hmota
ENG	Endoglin	Protein endoglin
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblastový růstový faktor
HCC	Hepatocellular carcinoma	Hepatocelulární karcinom
Hh	Hedgehog pathway	Hedgehog signalizační kaskáda
HSC	Hepatic stellate cells	Jaterní hvězdicovitá buňka
IL	Interleukin	Signalní protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogen aktivující proteinkináza
MMP	Matrix metaloproteinase	Matrixová metaloproteináza
NK buňky	Natural killer cells	Přirození zabíječi
NO	Nitric oxide	Oxid dusnatý
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PDGF	Platelet derived growth factor	Růstový faktor krevních destiček
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktivní formy kyslíku
SMAD	Small mothers against Decapentaplegic	Proteiny kaskády, druzí poslové

TGF-β	Tumor growth factor β	Transformující růstový faktor β
TRC105	Carotuximab	Monoklonální protilátka proti endoglinu
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endotelový růstový faktor
ZP	Zona pellucida	Vrstva glykoproteinů, součást endoglinu

10. SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Chemikálie 37
Tab. 2. Master mix pro reverzní transkripci 42
Tab. 3. Primery pro RT-PCR ThermoFisher Scientific 42
Tab. 4. Rozložení vzorků na destičce pro PCR 42
Tab. 5. Seznam zkratek 54

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Detail jaterního lalůčku 11
Obrázek 2. Zásobení jaterního lalůčku 13
Obrázek 3. Jaterní fibróza 19
Obrázek 4. Exprese endoglinu 28
Obrázek 5. Struktura endoglinu 30

12. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Průtoková cytometrie pSMAD 2/3 45
Graf 2. PCR-vliv na ENG 47
Graf 3. PCR-vliv na COL1A1 48
Graf 4. PCR-vliv na ACTA2 49

13. POUŽITÁ LITERATURA

1. ABSHAGEN, Kerstin; KUHLA, Angela; GENZ, Berit a VOLLMAR, Brigitte. Anatomy and Physiology of the Hepatic Circulation. Online. In: LANZER, Peter (ed.). *PanVascular Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, s. 1-28. ISBN 978-3-642-37393-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-37393-0_142-1. [cit. 2024-08-05].

2. HAHN, Andrew W.; PAL, Sumanta K. a AGARWAL, Neeraj. Targeting Endoglin to Treat Metastatic Renal Cell Carcinoma: Lessons from Osler-Weber-Rendu Syndrome. Online. *The Oncologist*. 2019, roč. 24, č. 2, s. 143-145. ISSN 1083-7159. Dostupné z: https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0443. [cit. 2024-07-30].

3. AZBAZDAR, Yagmur; KARABICICI, Mustafa; ERDAL, Esra a OZHAN, Gunes. Regulation of Wnt Signaling Pathways at the Plasma Membrane and Their Misregulation in Cancer. Online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-634X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fcell.2021.631623. [cit. 2024-05-20].

4. BATALLER, Ramón a BRENNER, David A. Liver fibrosis. Online. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, roč. 115, č. 2, s. 209-218. ISSN 0021-9738. Dostupné z: https://doi.org/10.1172/JCI24282. [cit. 2024-05-17].

5. BLANCO, Francisco J.; GRANDE, María T.; LANGA, Carmen; OUJO, Barbara; VELASCO, Soraya et al. S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. Online. *Circulation Research*. 2008, roč. 103, č. 12, s. 1383-1392. ISSN 0009-7330. Dostupné z: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176552. [cit. 2024-08-16].

6. BORGES, Luciene; IACOVINO, Michelina; MAYERHOFER, Timothy; KOYANO-NAKAGAWA, Naoko; BAIK, June et al. A critical role for endoglin in the emergence of blood during embryonic development. Online. *Blood*. 2012, roč. 119, č. 23, s. 5417-5428. ISSN 0006-4971. Dostupné z: https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-391896. [cit. 2024-05-17].

7. BROSSA, Alessia; BUONO, Lola a BUSSOLATI, Benedetta. Effect of the monoclonal antibody TRC105 in combination with Sunitinib on renal tumor derived endothelial cells. Online. *Oncotarget*. 2018, roč. 9, č. 32, s. 22680-22692. ISSN 1949-2553. Dostupné z: https://doi.org/10.18632/oncotarget.25206. [cit. 2024-05-20].

8. CORDERO-ESPINOZA, Lucía a HUCH, Meritxell. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. Online. *Journal of Clinical Investigation*. 2018, roč. 128, č. 1, s. 85-96. ISSN 0021-9738. Dostupné z: https://doi.org/10.1172/JCI93562. [cit. 2024-08-17].

9. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016, s. 196-201. ISBN 978-80-247-4788-0. [cit. 2024-05-20].

10. DEWIDAR, Bedair; MEYER, Christoph; DOOLEY, Steven a MEINDL-BEINKER, and Nadja. TGF-β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. Online. *Cells*. 2019, roč. 8, č. 11. ISSN 2073-4409. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/cells8111419. [cit. 2024-08-15].

11. DOE, J. (2023). Lecture 49: Liver. Retrieved from Course Hero website: https://www.coursehero.com/file/18204780/Lecture-49-Liver/. [cit. 2024-07-30].

12. DOOLEY, Steven a TEN DIJKE, Peter. TGF-β in progression of liver disease. Online. *Cell and Tissue Research*. 2012, roč. 347, č. 1, s. 245-256. ISSN 0302-766X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00441-011-1246-y. [cit. 2024-08-15].

13. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009, s. 331-333. ISBN 978-80-247-3240-4. [cit. 2024-05-30].

14. EHRMANN, Jiří a HŮLEK, Petr. *Hepatologie*. Praha: Grada, 2010, s. 17-22. ISBN 978-80-247-3118-6. [cit. 2024-05-30].

15. FAKATAVA, Naati; MITARAI, Hiromi; YUDA, Asuka; HARAGUCHI, Akira; WADA, Hiroko et al. Actin alpha 2, smooth muscle, a transforming growth factor-β1-induced factor, regulates collagen production in human periodontal ligament cells via Smad2/3 pathway. Online. *Journal of Dental Sciences*. 2023, roč. 18, č. 2, s. 567-576. ISSN 19917902. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jds.2022.08.030. [cit. 2024-08-18].

16. FINNSON, Kenneth W. a PHILIP, Anie. Endoglin in liver fibrosis. Online. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2012, roč. 6, č. 1, s. 1-4. ISSN 1873-9601. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12079-011-0154-y. [cit. 2024-05-21].

17. FUKUHARA, Shigetomo, SAKO, Keisuke, NODA, Kazuomi, ZHANG, Jianghui, MINAMI, Masayoshi, MOCHIZUKI, Naoki. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence

and angiogenesis. *Histology and histopathology*, 2010, roč. *25*, č. 3, s. 387–396.Dostupné z: https://doi.org/10.14670/HH-25.387. [cit. 2024-05-29].

18. GAIKWAD, Mrinalini. Porta hepatis in relation to portal vein among Indians. Online. *Bioinformation*. 2022, roč. 18, č. 7, s. 630-633. ISSN 09738894. Dostupné z: https://doi.org/10.6026/97320630018630. [cit. 2024-05-18].

19. GALANIS, Evanthia; ANDERSON, S Keith; TWOHY, Erin; BUTOWSKI, Nicholas A; HORMIGO, Adilia et al. Phase I/randomized phase II trial of TRC105 plus bevacizumab versus bevacizumab in recurrent glioblastoma: North Central Cancer Treatment Group N1174 (Alliance). Online. *Neuro-Oncology Advances*. 2022, roč. 4, č. 1. ISSN 2632-2498. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac041. [cit. 2024-05-17].

20. GANDHI, Chandrashekhar R. Stellate Cells in Hepatic Immunological Tolerance. Online. In: *Stellate Cells in Health and Disease*. Elsevier, 2015, s. 227-250. ISBN 9780128001349. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800134-9.00014-2. [cit. 2024-05-17].

21. GAO, Lili; ZHANG, Zhenya; ZHANG, Peng; YU, Minghua a YANG, Tao. Role of canonical Hedgehog signaling pathway in liver. Online. *International Journal of Biological Sciences*. 2018, roč. 14, č. 12, s. 1636-1644. ISSN 1449-2288. Dostupné z: https://doi.org/10.7150/ijbs.28089. [cit. 2024-05-20].

22. GERRITS, Tessa; BROUWER, Isabella J.; DIJKSTRA, Kyra L.; WOLTERBEEK, Ron; BRUIJN, Jan A. et al. Endoglin Is an Important Mediator in the Final Common Pathway of Chronic Kidney Disease to End-Stage Renal Disease. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms24010646. [cit. 2024-05-21].

23. GOUGOS, Athanase; LETARTE, Michelle. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. J Immunol. 1988, roč. 141, č. 6, s. 1925-33, PMID: 3262644. [cit. 2024-08-14].

24. GOUGOS, Athanase; LETARTE, Michelle. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. J Biol Chem. 1990, roč. 265, č. 15, s. 8361-8364, PMID: 1692830. [cit. 2024-08-14].

25. GREGORY, Andrew L.; XU, Guangxu; SOTOV, Vladimir a LETARTE, Michelle Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. Online. *Placenta*. 2014, roč. 35, s. S93-S99. ISSN 01434004. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.020. [cit. 2024-08-14].

26. GUO, Xing a WANG, Xiao-Fan. Signaling cross-talk between TGF-β/BMP and other pathways. Online. *Cell Research*. 2009, roč. 19, č. 1, s. 71-88. ISSN 1001-0602. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/cr.2008.302. [cit. 2024-05-17].

27. HELLERBRAND, Claus. Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver. Online. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2013, roč. 465, č. 6, s. 775-778. ISSN 0031-6768. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00424-012-1209-5. [cit. 2024-06-22].

28. HIGASHI, Takaaki; FRIEDMAN, Scott L. a HOSHIDA, Yujin. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017, roč. 121, s. 27-42. ISSN 0169409X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007. [cit. 2024-08-17].

29. HOU, Wei a SYN, Wing-Kin. Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. Online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018, roč. 6. ISSN 2296-634X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00150. [cit. 2024-05-20].

30. HUANG, Qian; XIAO, Rui; LU, Jing; ZHANG, Yao; XU, Liang et al. Endoglin aggravates peritoneal fibrosis by regulating the activation of TGF-β/ALK/Smads signaling. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, roč. 13. ISSN 1663-9812. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fphar.2022.973182. [cit. 2024-05-30].

31. HŮLEK, Petr a URBÁNEK, Petr. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 257-281. ISBN 978-80-271-0394-2. [cit. 2024-05-20].

32. HYUN, Jeongeun; HAN, Jinsol; LEE, Chanbin; YOON, Myunghee a JUNG, Youngmi. Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 11. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms22115717. [cit. 2024-08-16].

33. CHELKAR, Mayuri; PANDA, Sipra. Flow cytometry: Principle and applications. Online. *The Pharma Journal*. 2020, roč. 9, č. 10, s. 06-09. ISSN 2349-8242. Dostupné z: https://www.thepharmajournal.com/archives/2020/vol9issue10/PartA/9-11-18-307.pdf. [cit. 2024-06-05].

34. ISHIBASHI, Hiromi; NAKAMURA, Minoru; KOMORI, Atsumasa; MIGITA, Kiyoshi a SHIMODA, Shinji. Liver architecture, cell function, and disease. Online. *Seminars in Immunopathology*. 2009, roč. 31, č. 3, s. 399-409. ISSN 1863-2297. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00281-009-0155-6. [cit. 2024-08-05].

35. JENG, Kuo-Shyang; SHEEN, I-Shyan; LIN, Shu-Sheng; LEU, Chuen-Miin a CHANG, Chiung-Fang. The Role of Endoglin in Hepatocellular Carcinoma. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms22063208. [cit. 2024-05-17].

36. KELLY, Deirdre. Liver Failure. Online. In: *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*. Elsevier, 2011, s. 840-852.e3. ISBN 9781437707748. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0774-8.10077-6 . [cit. 2024-05-29].

37. KIM, Sun Kyung; HENEN, Morkos A HINCK, Andrew P. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. Online. *Experimental Biology and Medicine*. 2019, roč. 244, č. 17, s. 1547-1558. ISSN 1535-3702. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/1535370219881160. [cit. 2024-05-20].

38. KOPAN, R. Notch Signaling. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, roč. 4, č. 10, s. a011213-a011213. ISSN 1943-0264. Dostupné z: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213. [cit. 2024-05-20].

39. LAUTT, W. Wayne a MACEDO, M. Paula. Hepatic Circulation and Toxicology. Online. *Drug Metabolism Reviews*. 2010, roč. 29, č. 1-2, s. 369-395. ISSN 0360-2532. Dostupné z: https://doi.org/10.3109/03602539709037589. [cit. 2024-05-20].

40. LEBRIN, Franck; GOUMANS, Marie-José; JONKER, Leon; CARVALHO, Rita L C; VALDIMARSDOTTIR, Gudrun et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-β/ALK1 signal transduction. Online. *The EMBO Journal*. 2004, roč. 23, č. 20, s. 4018-4028. ISSN 0261-4189. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600386. [cit. 2024-05-30].

41. LIM, Yiting a MATSUI, William. Hedgehog Signaling in Hematopoiesis. Online. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2010, roč. 20, č. 2, s. 129-139. ISSN 1045-4403. Dostupné z: https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.30. [cit. 2024-05-17].

42. LITWINIUK-KOSMALA, Małgorzata; MAKUSZEWSKA, Maria a CZESAK, Małgorzata. Endoglin in head and neck neoplasms. Online. *Frontiers in Medicine*. 2023, roč. 10. ISSN 2296-858X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1115212. [cit. 2024-06-20].

43. LIU, Shu Qing; DENG, Xing; ZHU, Chang Peng; CUI, Ya Lu; XIE, Wei Fen et al. Depletion of Tgfbr2 in hepatocytes alleviates liver fibrosis and restores hepatic function in fibrotic mice. Online. *Journal of Digestive Diseases*. 2023, roč. 24, č. 1, s. 39-50. ISSN 1751-2972. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/1751-2980.13161. [cit. 2024-08-17].

44. LIU, Yingmiao; PAAUWE, Madelon; NIXON, Andrew B. a HAWINKELS, Lukas J.A.C. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms22010147. [cit. 2024-05-24].

45. LOUVET, Alexandre a MATHURIN, Philippe. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015, roč. 12, č. 4, s. 231-242. ISSN 1759-5045. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.35. [cit. 2024-05-17].

46. LUO, Dian Zhong. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. Online. *World Journal of Gastroenterology*. 2000, roč. 6, č. 1. ISSN 1007-9327. Dostupné z: https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i1.1. [cit. 2024-05-17].

47. LUO, Jinjin; LI, Jiaqi; LI, Peng; LIANG, Xi; HASSAN, Hozeifa Mohamed et al. Acute-on-chronic liver failure: far to go—a review. Online. *Critical Care*. 2023, roč. 27, č. 1. ISSN 1364-8535. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s13054-023-04540-4. [cit. 2024-08-16].

48. MARING, Janita A.; TROJANOWSKA, Maria a TEN DIJKE, Peter. Role of Endoglin in Fibrosis and Scleroderma. Online. In: *International Review of Cell and Molecular Biology Volume 297*. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, 2012, s. 295-308. ISBN 9780123943088. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394308-8.00008-X. [cit. 2024-05-20].

49. MCCONNELL, Matthew a IWAKIRI, Yasuko. Biology of portal hypertension. Online. *Hepatology International*. 2018, roč. 12, č. S1, s. 11-23. ISSN 1936-0533. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12072-017-9826-x. [cit. 2024-08-16].

50. MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. Online. *Current Protocols in Immunology*. 2018, roč. 120, č. 1. ISSN 1934-3671. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/cpim.40. [cit. 2024-06-04]. - 1

51. MCKINNON, Katherine M. Multiparameter Conventional Flow Cytometry. Online. In: HAWLEY, Teresa S. a HAWLEY, Robert G. (ed.). *Flow Cytometry Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2018, s. 139-150. ISBN 978-1-4939-7344-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_8. [cit. 2024-06-05]. - 2

52. MERCHANT, Akil A. a MATSUI, William. Smoothening the Controversial Role of Hedgehog in Hematopoiesis. Online. *Cell Stem Cell*. 2009, roč. 4, č. 6, s. 470-471. ISSN 19345909. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.006. [cit. 2024-05-17].

53. MEURER, K Steffen; ALSAMMAN, Muhammad; SCHOLTEN, David a WEISKIRCHEN, Ralf. Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World J Biol Chem*. 2014, roč. 5, č. 2, s. 180–203. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4050112/. [cit. 2024-06-25].

54. MEURER, Steffen K. a WEISKIRCHEN, Ralf. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms21239247. [cit. 2024-05-20].

55. MITCHELL, Dianne; POBRE, Eileen G.; MULIVOR, Aaron W.; GRINBERG, Asya V.; CASTONGUAY, Roselyne et al. ALK1-Fc Inhibits Multiple Mediators of Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. Online. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010, roč. 9, č. 2, s. 379-388. ISSN 1535-7163. Dostupné z: https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0650. [cit. 2024-08-18].

56. National Human Genome Research Institute. 2020, October 15. Polymerase Chain Reaction (PCR) Fact Sheet. https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet. [cit. 2024-06-04].

57. NEČAS, Emanuel, a kol., *Patologická fyziologie orgánových systémů, část II.* 2. vyd., Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006, s. 150-160. ISBN 80-246-0674-7 Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.026. [cit. 2024-08-23].

58. OUJO, Beatriz; PEREZ-BARRIOCANAL, Felipe; BERNABEU, Cristóbal a LOPEZ-NOVOA, José; Membrane and Soluble Forms of Endoglin in Preeclampsia. Online. *Current Molecular Medicine*. 2013, roč. 13, č. 8, s. 1345-1357. ISSN 15665240. Dostupné z: https://doi.org/10.2174/15665240113139990058. [cit. 2024-06-26].

59. PATON, Emily L.; TURNER, Jacqueline A. a SCHLAEPFER, Isabel R. Overcoming Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutated Tumours. Online. *Journal of Oncology*. 2020, roč. 2020, s. 1-14. ISSN 1687-8450. Dostupné z: https://doi.org/10.1155/2020/1079827. [cit. 2024-06-26].

60. PENG, Hui; WISSE, Eddie a TIAN, Zhigang. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. Online. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016, roč. 13, č. 3, s. 328-336. ISSN 1672-7681. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/cmi.2015.96. [cit. 2024-05-17].

61. PIERELLI, Luca; BONANNO, Giuseppina; RUTELLA, Sergio; MARONE, Maria; SCAMBIA, Giovanni et al. CD105 (Endoglin) Expression on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Online. *Leukemia and Lymphoma*. 2001, roč. 42, č. 6, s. 1195-1206. ISSN 1042-8194. Dostupné z: https://doi.org/10.3109/10428190109097744. [cit. 2024-05-20].

62. POPOVICIU, Mihaela Simona; PADURARU, Lorena; NUTAS, Raluca Marinela; UJOC, Alexandra Maria; YAHYA, Galal et al. Diabetes Mellitus Secondary to Endocrine Diseases: An Update of Diagnostic and Treatment Particularities. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 16. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms241612676. [cit. 2024-05-17].

63. POUGET, Clair; PETERKIN, Tessa; COSTA SIMÕES, Filipa; LEE, Yoonsung; TRAVER, David et al. FGF signalling restricts haematopoietic stem cell specification via modulation of the BMP pathway. *Nature Communications*. 2014, roč. 5, č. 5588. ISSN 2041-1723. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/ncomms6588. [cit. 2024-07-19].

64. ROCKEY, Don C.; WEYMOUTH, Nate; SHI, Zengdun a AVILA, Matias A. Smooth Muscle α Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. Online. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 10. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077166. [cit. 2024-08-19].

65. RODRÍGUEZ-BARBERO, Alicia; OBREO, Juana; ÁLVAREZ-MUÑOZ, Patricia; PANDIELLA, Atanasio; BERNABÉU, Carmelo et al. Endoglin Modulation of TGF-ß1-Induced Collagen

Synthesis is Dependent on ERK1/2 MAPK Activation. Online. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2006, roč. 18, č. 1-3, s. 135-142. ISSN 1015-8987. Dostupné z: https://doi.org/10.1159/000095181. [cit. 2024-08-29].

66. Roche, Sean P.;Kobos, Rebecca. Jaundice in the adult patient. Am Fam Physician. 2004, Jan 15, roč. 69, č. 2, s. 299-304. PMID: 14765767. Dostupné z: https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2004/0115/p299.html. [cit. 2024-08-14].

67. ROSEN, Lee S.; GORDON, Michael S.; ROBERT, Francisco a MATEI, Daniela E. Endoglin for Targeted Cancer Treatment. Online. *Current Oncology Reports*. 2014, roč. 16, č. 2. ISSN 1523-3790. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11912-013-0365-x. [cit. 2024-08-17].

68. ROSEN, Lee S.; HURWITZ, Herbert I.; WONG, Michael K.; GOLDMAN, Jonathan; MENDELSON, David S. et al. A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. Online. *Clinical Cancer Research*. 2012, roč. 18, č. 17, s. 4820-4829. ISSN 1078-0432. Dostupné z: https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0098. [cit. 2024-05-22].

69. RUIZ-LLORENTE, Lidia; VEGA, M. Cristina; FERNÁNDEZ, Francisco J.; LANGA, Carmen; MORRELL, Nicholas W. et al. Generation of a Soluble Form of Human Endoglin Fused to Green Fluorescent Protein. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 20. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms222011282. [cit. 2024-06-25].

70. SÁNCHEZ-ELSNER, Tilman; BOTELLA, Luisa M.; VELASCO, Beatriz; LANGA, Carmen a BERNABÉU, Carmelo. Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor-β Pathways. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, roč. 277, č. 46, s. 43799-43808. ISSN 00219258. Dostupné z: https://doi.org/10.1074/jbc.M207160200. [cit. 2024-05-20].

71. SENOO, Haruki. Structure and function of hepatic stellate cells. Online. *Medical Electron Microscopy*. 2004, roč. 37, č. 1, s. 3-15. ISSN 0918-4287. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00795-003-0230-3. [cit. 2024-05-17].

72. SCHARPFENECKER, Marion; VAN DINTHER, M.; LIU, Zhen; VAN BEZOOIJEN, R.L.; ZHAO, Qinghai et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. Online. *Journal of Cell Science*. 2007, roč. 120, č. 6, s. 964-972. ISSN 1477-9137. Dostupné z: https://doi.org/10.1242/jcs.002949. [cit. 2024-08-19].

73. SCHOONDERWOERD, Mark J.A.; GOUMANS, Marie-Jose T.H. a HAWINKELS, Lukas J.A.C. Endoglin: Beyond the Endothelium. Online. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 2. ISSN 2218-273X. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/biom10020289. [cit. 2024-05-17].

74. SCHOONDERWOERD, Mark JA; HAKUNO, Sarah K; SASSEN, Martijn; KUHLEMAIJER, Eleonore B; PAAUWE, Madelon et al. Targeting Endoglin Expressing Cells in the Tumor Microenvironment Does Not Inhibit Tumor Growth in a Pancreatic Cancer Mouse Model. Online. *OncoTargets and Therapy*. 2021, roč. 14, s. 5205-5220. ISSN 1178-6930. Dostupné z: https://doi.org/10.2147/OTT.S322276. [cit. 2024-08-20].

75. SCHUPPAN, Detlef a AFDHAL, Nezam H. Liver cirrhosis. Online. *The Lancet*. 2008, roč. 371, č. 9615, s. 838-851. ISSN 01406736. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9. [cit. 2024-06-21].

76. SONG, Xudong; SHI, Jiayi; LIU, Jieting; LIU, Yong; YU, Yang et al. Recombinant truncated latency-associated peptide alleviates liver fibrosis in vitro and in vivo via inhibition of TGF-β/Smad pathway. Online. *Molecular Medicine*. 2022, roč. 28, č. 1. ISSN 1076-1551. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s10020-022-00508-2. [cit. 2024-08-20].

77. STRAVITZ, R Todd; LEE, William M. Acute liver failure. Online. *The Lancet*. 2019, roč. 394, č. 10201, s. 869-881. ISSN 01406736. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31894-X. [cit. 2024-08-16].

78. TEN DIJKE, Peter; GOUMANS, Marie-José a PARDALI, Evangelia. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. Online. *Angiogenesis*. 2008, roč. 11, č. 1, s. 79-89. ISSN 0969-6970. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10456-008-9101-9. [cit. 2024-06-20].

79. THIELEN, Nathalie; VAN DER KRAAN, Peter a VAN CAAM, Arjan. TGFβ/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. Online. *Cells*. 2019, roč. 8, č. 9. ISSN 2073-4409. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/cells8090969. [cit. 2024-05-17].

80. THOMPSON, Wendy L. a TAKEBE, Takanori. Human liver model systems in a dish. Online. *Development, Growth & Differentiation*. 2021, roč. 63, č. 1, s. 47-58. ISSN 0012-1592. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/dgd.12708. [cit. 2024-08-05].

81. THURSTON, Gavin; DALY, Christopher. The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012,

roč. 2, č. 9, s. a006650-a006650. ISSN 2157-1422. Dostupné z: https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006650. [cit. 2024-06-24].

82. TOMA, Diana; LAZAR, Ovidiu a BONTAS, Ecaterina. Acute Liver Failure. Online. In: RADU-IONITA, Florentina; PYRSOPOULOS, Nikolaos T.; JINGA, Mariana; TINTOIU, Ion C.; SUN, Zhonghua et al. (ed.). *Liver Diseases*. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 369-380. ISBN 978-3-030-24431-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24432-3_32. [cit. 2024-05-29].

83. TRIPSKA, Katarina; IGREJA SÁ, Ivone Cristina; VASINOVA, Martina; VICEN, Matej; HAVELEK, Radim et al. Monoclonal anti-endoglin antibody TRC105 (carotuximab) prevents hypercholesterolemia and hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. Online. *Frontiers in Medicine*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-858X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fmed.2022.845918. [cit. 2024-05-17].

84. TSUCHIDA, Takuma a FRIEDMAN, Scott L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017, roč. 14, č. 7, s. 397-411. ISSN 1759-5045. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38. [cit. 2024-05-21].

85. VAN GRUNSVEN, Leo A. 3D in vitro models of liver fibrosis. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017, roč. 121, s. 133-146. ISSN 0169409X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.004. [cit. 2024-06-20].

86. Wilhelm Zdeněk, Hegyi Peter. Fyziologie jater časopis 2007; roč. 3, č. 5, s. 242-245, dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/lek-200705-0015_Fyziologie_jater.php. [cit. 2024-05-30].

87. YAN, Yufei; ZENG, Jiefei; XING, Linhao a LI, Changyong. Extra- and Intra-Cellular Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. Online. *Biomedicines*. 2021, roč. 9, č. 8. ISSN 2227-9059. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/biomedicines9081014. [cit. 2024-05-20].

88. YANG, Fangming; LI, Heng; LI, Yanmin; HAO, Yaokun; WANG, Chenxiao et al. Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis. Online. *International Immunopharmacology*. 2021, roč. 99. ISSN 15675769. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108051. [cit. 2024-05-21].

89. YEOH, Joyce S.G.; VAN OS, Ronald; WEERSING, Ellen; AUSEMA, Albertina; DONTJE, Bert et al. Fibroblast Growth Factor-1 and -2 Preserve Long-Term Repopulating Ability of

Hematopoietic Stem Cells in Serum-Free Cultures. Online. *Stem Cells*. 2006, roč. 24, č. 6, s. 1564-1572. ISSN 1066-5099. Dostupné z: https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0439. [cit. 2024-05-20].

90. ZHANG, Hejiao; SHEN, Haiyuan; ZHOU, Liangliang; XIE, Linxi; KONG, Derun et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells in the Digestive System: Defender or Destroyer? Online. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2023, roč. 15, č. 4, s. 809-819. ISSN 2352345X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.12.014. [cit. 2024-06-21].

91. ZHANG, Yuan-Yao a MENG, Zhong-Ji. Definition and classification of acute-on-chronic liver diseases. Online. *World Journal of Clinical Cases*. 2022, roč. 10, č. 15, s. 4717-4725. ISSN 2307-8960. Dostupné z: https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i15.4717. [cit. 2024-08-16].

92. ZHU, Bo; CHAN, Siu-Lung; LI, Jack; LI, Kathryn; WU, Hao et al. Non-alcoholic Steatohepatitis Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Online. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021, roč. 8. ISSN 2297-055X. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.742382. [cit. 2024-05-25].