

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Morfologické změny v ledvinách u myší s vysokou
expresí solubilního endoglinu

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

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 12. 5. 2019

Bc. Martina Vyskočilová

Poděkování

V první řadě bych touto formou ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Ivaně Němečkové Ph.D. za odborné vedení a dohled, stejně tak i za trpělivost, ochotu a čas, který mi při psaní této práce věnovala. Mé poděkování patří také paní laborantce Pavlíně Lukešové za vstřícnost, za dohled při práci v laboratoři a odbornou pomoc při zpracování experimentální části této práce. V neposlední řadě patří velké poděkování také mé rodině a příteli za podporu nejen při psaní diplomové práce, ale i v průběhu celého studia.

ABSTRAKT

Diplomová práce

Morfologické změny v ledvinách u myší s vysokou expresí solubilního endoglinu

Autor: Bc. Martina Vyskočilová

Studijní program: Zdravotnická bioanalýtika

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Cíl práce: Endoglin (Eng) je transmembránový glykoprotein označovaný jako přídatný receptor typu III pro transformující růstový faktor β (TGF- β) a je exprimován primárně na povrchu endotelových buněk. Endoglin hraje roli v cévní homeostáze, angiogenezi a kardiovaskulárním vývoji. Solubilní endoglin (sEng), který vzniká odštěpením extracelulární části membránového endoglinu, vylučuje TGF- β molekuly v séru a znemožňuje jim tak navázání na membránový receptor. Solubilní endoglin je považován za spouštěč endotelové dysfunkce, díky čemuž je spojován s kardiovaskulárními chorobami a patogenezi preeklampsie. Cílem této práce je popsat případný účinek vysokých hladin solubilního endoglinu na tkáň ledvin u transgenních myší v porovnání s ledvinami myší s nízkou hladinou lidského solubilního endoglinu.

Metody: Ledviny dvanáctiměsíčních myší s vysokými i normálními hladinami lidského solubilního endoglinu krmených standardní laboratorní dietou byly fixovány ve 4% formaldehydu, zality do parafínu a nakrájeny na řezy o tloušťce 7 μ m. Jeden z řezů byl obarven hematoxylinem-eosinem, druhý zeleným trichromem. Barvení hematoxylinem-eosinem je barvení používané k orientačnímu zobrazení histologické stavby tkáně, barvení zeleným trichromem slouží k zobrazení případných změn kolagenního vaziva.

Výsledky a závěr: Při mikroskopickém pozorování preparátů ledvin jsme pozorovali změny renální tkáně ve skupině samic myší s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu. Konkrétně se jednalo o výskyt hyalínu v tubulech ve dřeni ledviny. U žádné další skupiny jsme nález hyalínu nepotvrdili. Předpokládáme, že výskyt hyalínu je způsoben hromaděním proteinů v ledvinách, avšak není zcela jasné, proč jsme jeho nález nedetekovali i v ledvinách samic s vysokými hladinami lidského sEng.

Klíčová slova: solubilní endoglin, ledviny, hyalín, transgenní model myší

ABSTRACT

Masters thesis

Morphological alterations in kidneys in mice with high soluble endoglin levels

Author: Bc. Martina Vyskočilová

Study program: Medical bioanalytics

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Background: Endoglin (Eng) is a transmembrane glycoprotein also known as an accessory receptor type III for a TGF- β molecule which is expressed primarily on the surface of endothelial cells. Endoglin plays a role in vascular homeostasis, angiogenesis and cardiovascular development. Soluble endoglin (sEng) which is formed by a cleavage of an extracellular part of a membrane-bound endoglin scavenges the TGF- β molecules in the serum and blocks their binding to the membrane-bound receptor. Soluble endoglin is considered as a trigger of an endothelial dysfunction which is associated with cardiovascular diseases and pathogenesis of preeclampsia. The aim of this study is to describe possible effect of high levels of a soluble endoglin on kidney tissue of transgenic mice in comparison with kidneys of mice with low levels of a human soluble endoglin.

Methods: Kidneys of twelve months old mice with high and normal levels of a human soluble endoglin on a standard laboratory diet were fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin and sliced into 7 μm thin sections. One of these sections was stained with hematoxylin-eosin, the other one with green trichrome. Hematoxylin-eosin staining is used for basic orientation in a histological structure of tissue, staining with green trichrome is used for potential alterations in a collagenous tissue.

Results and conclusion: After the microscopic observation of kidney preparations we observed some changes in renal tissue in a group of female mice with high levels of a human soluble endoglin. It was particularly about an occurrence of hyaline in tubules of renal medulla. We did not confirm presence of hyaline in any other group. We suppose that the presence of hyaline is caused by accumulation of proteins in kidneys, however it is unclear why we did not detect hyaline in males with high levels of human sEng as well.

Keywords: soluble endoglin, kidneys, hyaline, transgenic mouse model

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	LEDVINY.....	10
3.1.1	Anatomie ledvin.....	10
3.1.2	Histologie ledvin.....	12
3.1.2.1	Bowmanovo pouzdro.....	12
3.1.2.2	Glomerulus.....	12
3.1.2.3	Proximální tubulus.....	14
3.1.2.4	Henleova klička.....	14
3.1.2.5	Distální tubulus.....	14
3.1.3	Funkce ledvin.....	16
3.1.3.1	Regulace glomerulární filtrace a průtoku krve ledvinami.....	16
3.1.3.2	Úloha ledvin v regulaci vodní a elektrolytové rovnováhy.....	17
3.1.3.3	Úloha ledvin ve vylučování vody a v tvorbě moči.....	19
3.1.3.4	Udržování acidobazické rovnováhy.....	19
3.1.3.5	Produkce hormonů.....	20
3.2	ENDOGLIN A JEHO SOLUBILNÍ FORMA.....	22
3.2.1	Endoglin.....	22
3.2.1.1	Role endoglinu v TGF- β signalizaci.....	22
3.2.1.2	Význam endoglinu a TGF- β signalizace.....	24
3.2.1.3	Struktura.....	25
3.2.2	Solubilní forma endoglinu.....	28
3.2.2.1	Vznik sEng.....	28
3.2.2.2	Důsledky působení sEng.....	29
3.2.2.3	sEng v souvislosti s onemocněními.....	29
3.3	ZVÍŘECÍ MODELY.....	33
3.3.1	Důvody použití.....	35
3.3.2	Výhody a nevýhody využití pokusných zvířat.....	36
3.3.3	Teorie 3 R.....	36
3.3.4	Genetika laboratorních zvířat.....	37

3.3.5	Model myši s vysokou hladinou sEng	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	LABORATORNÍ ZVÍŘATA	39
4.2	HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ	40
4.2.1	Barvení preparátů	42
4.2.1.1	Barvení hematoxylinem-eosinem	42
4.2.1.2	Zelený trichrom	44
4.3	FOTODOKUMENTACE PREPARÁTŮ	45
5	VÝSLEDKY	46
6	DISKUZE	54
7	ZÁVĚR	56
8	POUŽITÉ ZKRATKY	57
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
10	SEZNAM GRAFŮ	60
11	SEZNAM TABULEK	60
12	CITOVANÁ LITERATURA	61

1 ÚVOD

Endoglin (Eng, CD105) je transmembránový glykoprotein exprimovaný primárně na povrchu endotelových buněk. Endoglin je součástí komplexu TGF- β (transforming growth factor β) receptorů a podílí se na modulaci buněčné odpovědi právě na tento cytokin. TGF- β je multifunkční cytokin a hraje roli v proliferaci a diferenciaci mnoha různých typů buněk. Vzhledem k tomu, že přítomnost endoglinu je k tomuto procesu nutná, při nedostatečné expresi endoglinu nedochází k proliferaci buněk. Endoglin hraje významnou roli v angiogenezi, cévní homeostáze a kardiovaskulárním vývoji.

Solubilní endoglin (sEng) je sérová molekula vznikající odštěpením extracelulární části membránově vázaného endoglinu. Do oběhu je vyplavován především následkem poškození endotelu. Jeho role spočívá ve vychytávání cirkulujícího TGF- β , čímž blokuje jeho navázání na membránově vázaný endoglin. Důsledkem toho má solubilní endoglin antiangiogenní účinky a je považován za spouštěč endotelové dysfunkce a hypertenze, díky čemuž je mu připisována role v patogenezi preeklampsie. V poslední době je také ve větší míře využíván jako biomarker kardiovaskulárních onemocnění, zvláště pak aterosklerózy, diabetu či hypertenze.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na morfologické hodnocení ledvin u jediného transgenního myšího modelu pro studium účinků solubilního endoglinu, abychom rozšířili spektrum dosavadních poznatků o tomto doposud málo prostudovaném modelu.

2 ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE

Cíl této diplomové práce spočívá v morfologickém hodnocení změn v ledvinách u transgenního modelu myši exprimujících vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu, v porovnání s ledvinami myši z kontrolní skupiny exprimujících nízké hladiny lidského solubilního endoglinu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 LEDVINY

Ledviny jsou párovým orgánem, uloženým retroperitoneálně po obou stranách bederní části páteře, který spolu s močovody, močovým měchýřem a močovou trubicí tvoří močový systém. Hlavní funkcí ledvin je udržování homeostázy v těle tvorbou moči, se kterou se z těla vylučují různé odpadní produkty metabolismu. Neméně významnou funkcí ledvin je také regulace rovnováhy tekutin a elektrolytů a produkce hormonů. (1)

3.1.1 Anatomie ledvin

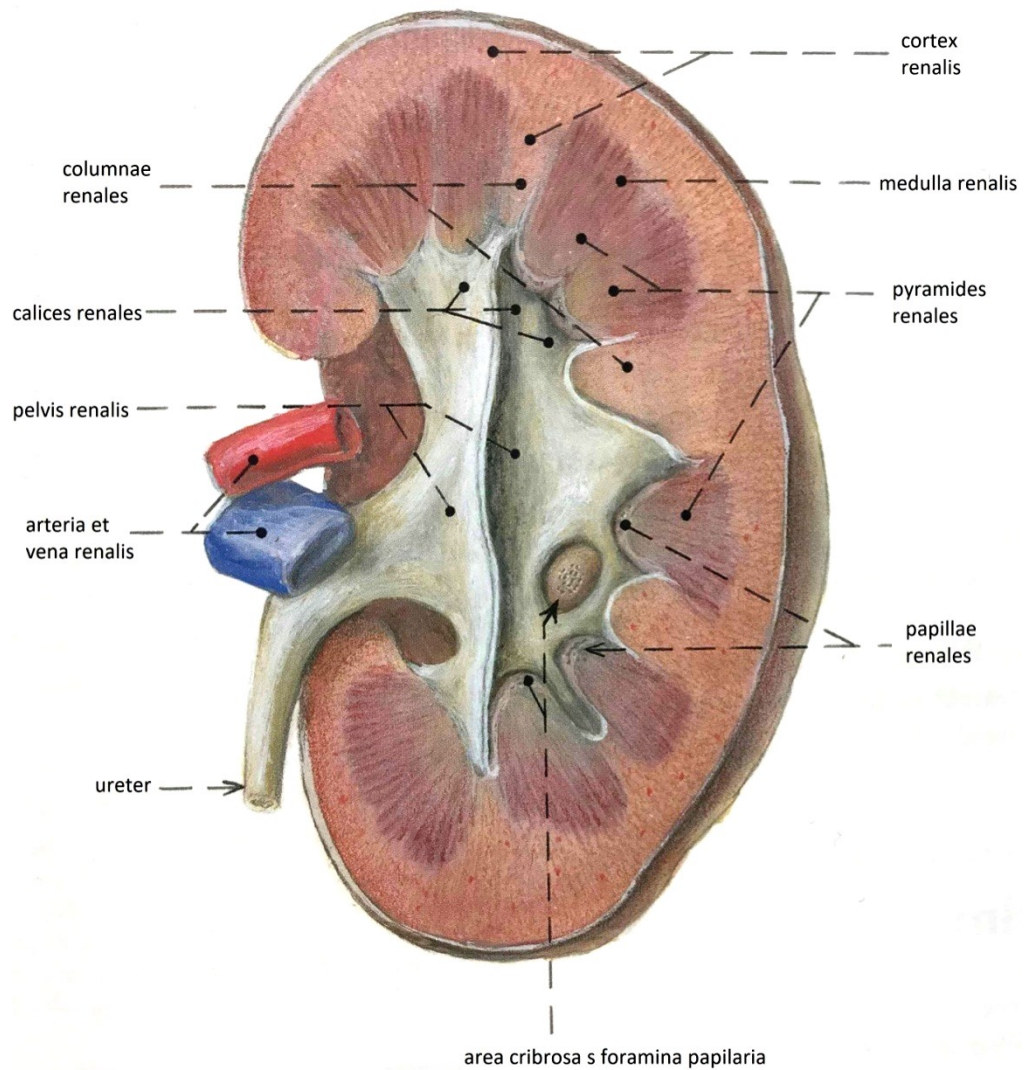
Ledviny, latinsky *renes*, se nachází po obou stranách páteře v bederní oblasti. Vyznačují se charakteristickým oválným, fazolovitým tvarem, na povrchu jsou hladké a mají červenohnědou barvu. Každá ledvina váží přibližně 120 -170 g, u žen bývá zpravidla menší než u mužů. (2)

Co se týče anatomického rozdělení ledvin, každá ledvina je v jedné vrstvě obklopena vazivovým pouzdem (*capsula fibrosa*), v druhé vrstvě je pak kryta tukovou tkání (*capsula adiposa*). Obě tyto vrstvy mají za úkol chránit ledvinu před mechanickým poškozením. Na vnitřním konkávním okraji ledviny se nachází hilus (*hilum renale*), tedy místo vstupu a výstupu cév vyživujících ledvinu. Hilus zároveň slouží jako odvodné místo pro močovod, který ústí z pánvičky ledvinné (*pelvis renalis*) vystylající dutinu (*sinus renalis*), která je obklopena parenchymem. (3)

Samotný parenchym, tedy ledvinná tkáň, se skládá ze dvou struktur – dřene (*medulla renalis*) a kůry (*cortex renalis*). Dřeň ledviny je složena z 15-20 ledvinných pyramid (*pyramides renales*), (2) jejichž spodní strana je směřována k povrchu ledviny a tvoří hranici mezi kůrou a dřením. Mezi těmito pyramidami vybíhá kůra ledviny a tvoří typické *columnae renales*. Vrcholky pyramid se nazývají ledvinné papily (*papillae renales*) a vyznačují se tím, že na sobě mají otvory (*foramina papillaria*) představující ústí kanálků (*ductus papillares*). Tato oblast se nazývá *area cribriformis*. Na vrcholky papil pak nasedají kalichy ledvin (*calices renales*). Každá ledvinná pyramida s přilehlou částí kůry tvoří ledvinný lalok (*lobus renalis*). Takovýchto laloků je v ledvině možno

nalézt kolem osmi až osmnácti. (3) (4) Na Obrázku 1 je pak možné vidět řez ledvinou s popisem jejích částí.

Co se týče cévního zásobení, ledviny jsou zásobovány renální artérií, jakožto hlavní větví odstupující z břišní aorty. Renální artérie se dále větví na menší větve, až ke vzniku aferentních arterioli (viz. 3.1.2). (5)



Obrázek 1 - Frontální řez ledvinou

(Převzato a upraveno z: (2))

3.1.2 Histologie ledvin

Základní funkční a morfológickou jednotkou ledvin je nefron. Každou lidskou ledvinu tvoří přibližně milion nefronů, některá literatura však uvádí dvojnásobné až čtyřnásobné číslo. (1) Každý nefron je tvořen dvěma základními částmi a to ledvinovým tělískem, zvaným také Malphigiho tělísko a renálními tubuly. (5) (6)

Ledvinové tělísko, znázorněné na Obrázku 2, které má v průměru přibližně kolem 200 μm , se skládá ze dvou hlavních částí – z glomerulu a Bowmanova pouzdra obklopujícího glomerulus. Glomerulus je označován jako klubičko kapilár, svazek dvaceti až čtyřiceti kapilárních klíčků. Na toto „klubičko“ navazují jednotlivé tubuly, počínaje proximálním tubulem, který je složen ze stočené a rovné části. Na proximální tubulus přímo navazuje Henleova klíčka, která sestává z tenkého sestupného, tenkého vzestupného a tlustého vzestupného raménka. Henleova klíčka poté přechází v distální tubulus napojený na sběrací kanálek, který odvádí moč do pánvičky ledvinné. (5)

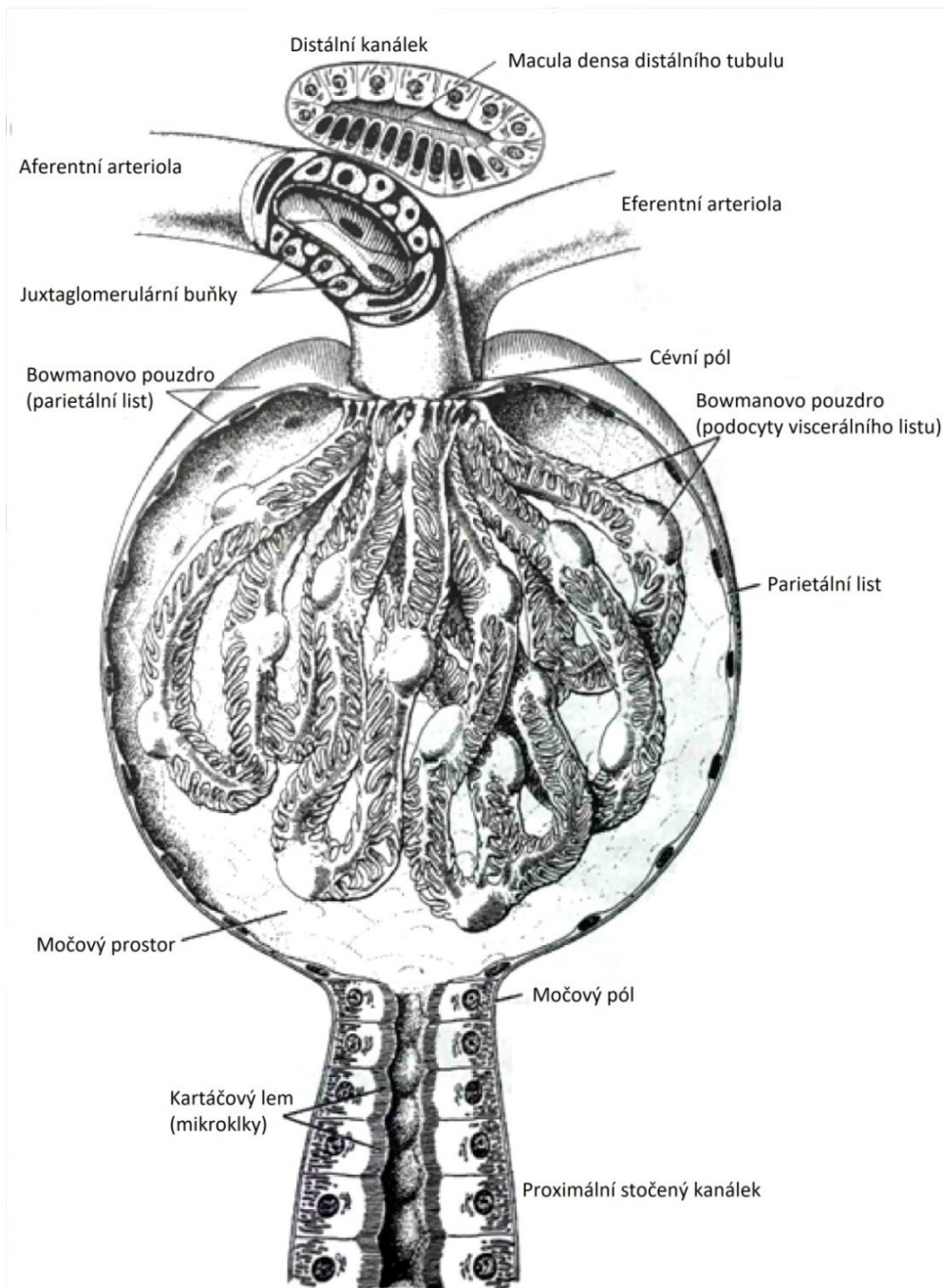
3.1.2.1 Bowmanovo pouzdro

Bowmanovo pouzdro je tvořeno dvěma listy, přičemž vnitřní (viscerální) list je tvořen plochými buňkami, tzv. *podocyty*, které svými výběžky – *pedikly*, obalují bazální membránu kapilárních klíčků. Vnější (parietální) list je pak tvořen jednovrstevným dlaždicovým epitelem. Mezi těmito listy je prostor, do něhož je z krve odfiltrována primární moč. (7)

3.1.2.2 Glomerulus

Vlastní glomerulus má tzv. cévní pól, do něhož vstupuje *arteriola afferens* a vystupuje z něj *arteriola efferens* (nazývané také jako *vas afferens* a *vas efferens*) a močový pól, z něhož vystupuje proximální tubulus. *Arteriola afferens* se dělí na 2-5 primárních větví, které se dále dělí na kapiláry tvořící vlastní glomerulus. (1) Stěnu kapilár tvoří fenestrovaný kapilární endotel, který zastává funkci první složky filtrační membrány a plní tedy filtrační funkci tím, že zadržuje erytrocyty a další krevní buňky. Druhou složkou filtrační membrány je pak bazální membrána zachycující makromolekuly a poslední, třetí filtrační složkou jsou interpedunkulární štěrbinové podocyty propouštějící pouze částice menší než 4 nm. Výsledkem filtrace krve přes takovou membránu je primární moč, která, jak už bylo zmíněno, se dostává do prostoru mezi oběma listy Bowmanova pouzdra a pokračuje dále do systému tubulů. (8)

Glomerulus je kromě podocytů a endotelových buněk tvořen také tzv. mesangiálními buňkami vyskytujícími se převážně kolem arteriол a v místech větvení a spojování kapilár. Tyto buňky se společně s mesangiální matrix, kterou produkují, nazývají *mesangium*. Úkolem *mesangia* je zpevnění kapilární stěny, regulace glomerulární filtrace (GF) a v neposlední řadě také očišťování glomerulárního filtru umožněné jeho fagocytárními vlastnostmi. (2) (3)



Obrázek 2 - Ledvinové tělísko

(Převzato a upraveno z: (1))

3.1.2.3 Proximální tubulus

Proximální tubulus je přibližně 15 mm dlouhý kanálek, jehož stěna je tvořena jednou vrstvou kubického až cylindrického epitelu, spojeného tzv. *tight junctions*. Na laminární straně je proximální tubulus opatřen kartáčovým lemem tvořeným četnými mikrokly, které mají za úkol zvětšovat resorpční povrch. (1) (9) (10)

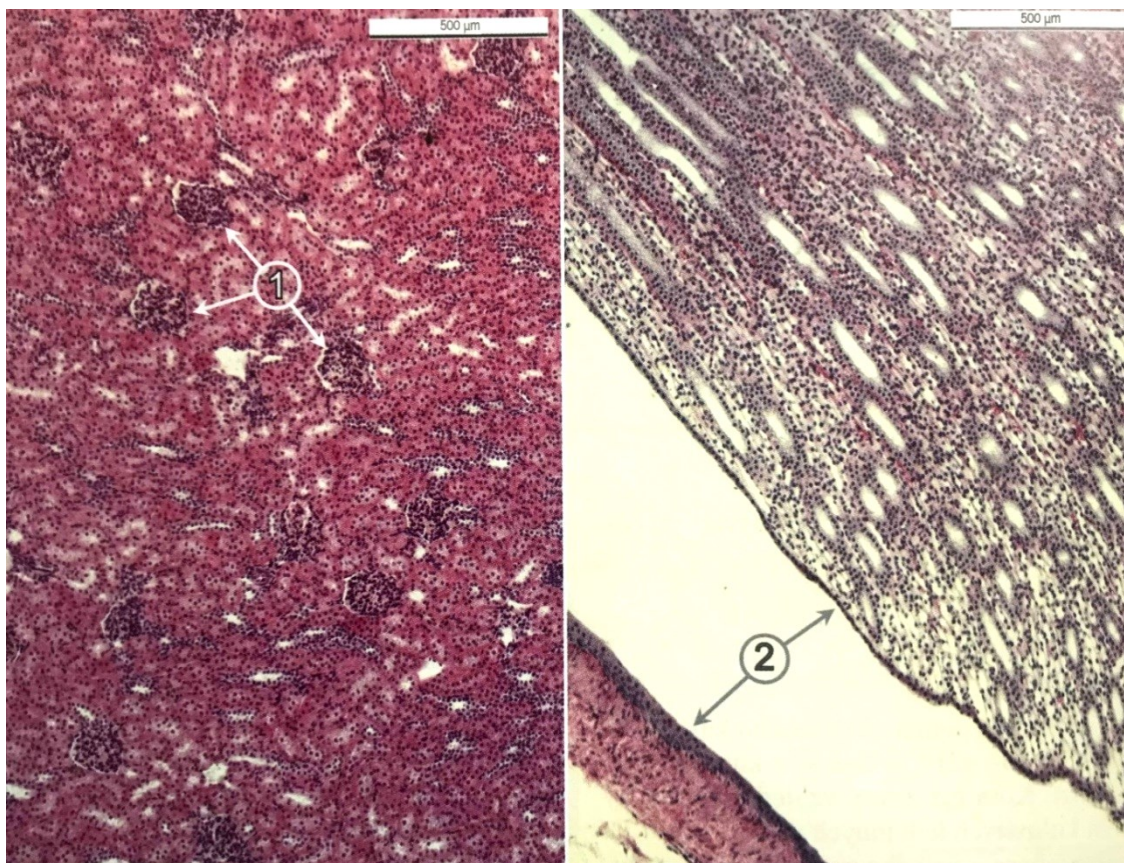
3.1.2.4 Henleova klička

Tenký úsek Henleovy kličky je tvořen malými plochými buňkami, které přecházejí v krychlové buňky s řidšími mikrokly tvořící povrch tlustého úseku kličky. Celková délka tenkého i tlustého úseku je přibližně 14-26 mm. Hlavní funkcí Henleovy kličky je zpětná resorpce vody a sodíku tzv. protiproudovým systémem. (2) V souvislosti s tím je nutností zmínit také rozdělení nefronů podle uložení na nefrony korové a juxtamedulární. Korové nefrony tvoří 85% všech nefronů a již podle názvu lze odvodit, že se jejich glomeruly nachází v kůře. Henleovy kličky těchto nefronů jsou krátké a dosahují pouze do zevní zóny dřeně. Naproti tomu juxtamedulární nefrony mají glomeruly uložené na rozhraní kůry a dřeně a jejich Henleovy kličky zasahují hluboko do dřeně ledvin. Jsou to právě juxtamedulární nefrony jejichž Henleovy kličky hrají velmi důležitou roli v protiproudovém systému, který slouží k zakoncentrování moči. (5)

3.1.2.5 Distální tubulus

Distální tubulus s délkou přibližně 5 mm je nejkratším tubulárním úsekem a je vystlán kubickým epitelem. (7) (9) Je složen z přímého úseku navazujícího na Henleovu kličku a z úseku stočeného, který ústí do sběracích kanálků. I zde dochází k resorpci vody a sodíku a mimo jiné i k výměně sodíku za draslík a vodík, což je základem okyselování moči. Mezi oběma úseky distálního tubulu se nachází tzv. *macula densa*, což je krátký tlustší úsek, který je součástí tzv. *juxtaglomerulárního aparátu*. (4) Juxtaglomerulární aparát je kromě buněk *macula densa* tvořen dalšími dvěma typy buněk a to sice: juxtaglomerulárními buňkami nacházejícími se ve stěně *arteriola afferens* a buňkami *extraglomerulárního mesangia*. (8) Funkce juxtaglomerulárních buněk je produkce hormonu reninu, který hraje roli v renin-angiotenzin-aldosteronovém systému, který má za úkol udržovat krevní tlak (TK). (1)

Histologická stavba ledvin s popisem je znázorněna na následujícím Obrázku 3.



Obrázek 3 - Přehledný obraz kůry (vlevo) a dřeně (vpravo) ledviny barvené H-E

1 – zrnitý vzhled dodávají kůře ledvinová tělíska, žíhaná struktura je podmíněna podélně proříznutými sběracími a vývodnými kanálky, 2 – přechodný epitel kryjící vnitřní povrch pánvičky i pyramidu zevně

(Převzato z: (7))

3.1.3 Funkce ledvin

Funkci ledvin můžeme rozdělit na tři hlavní okruhy. V první řadě jde o regulaci vodní, elektrolytové a acidobazické rovnováhy spolu s udržováním krevního tlaku. Neméně důležitou úlohou je odstraňování produktů metabolismu, solutů a tělu cizích látek tvorbou moči. Třetí, stejně důležitou funkcí ledvin je pak produkce hormonů. (5)

3.1.3.1 Regulace glomerulární filtrace a průtoku krve ledvinami

Základním procesem probíhajícím v ledvinách je filtrace krve a její očištění od nežádoucích látek tvorbou moči. Fyziologicky proteče denně ledvinami na 180 litrů krve, ze které jsou ledviny zdravého jedince schopny vytvořit přibližně 1-2 litry definitivní moči. (10) Tvorbu moči zajišťují tři mechanismy, a to sice: glomerulární filtrace, tubulární resorpce a tubulární sekrece. (6) Regulace průtoku krve ledvinou probíhá především na úrovni glomerulární filtrace několika různými mechanismy. (11)

Hnací silou filtrace v glomerulárních kapilárách jsou stejně jako v ostatních kapilárách v těle tzv. Starlingovy síly. Starlingovy síly určují pohyb kapaliny přes stěnu kapiláry a jsou dány zejména prostřednictvím poměru mezi hydrostatickým tlakem v kapilárách a onkotickým tlakem určeným plazmatickými bílkovinami. Je však nutno si uvědomit, že průtok krve glomerulárními kapilárami se od průtoku jinými kapilárami v těle liší. A to například tím, že glomerulární kapiláry jsou fenestrované, také tím, že k výměně tekutiny dochází mezi kapilárou a Bowmanovým váčkem (ne intersticiem) nebo také hodnotou hydrostatického tlaku, která určuje pohyb tekutiny pouze ve směru filtrace. Díky těmto odlišným vlastnostem glomerulárních kapilár probíhá i filtrace o poznání odlišněji. (6)

Jak je možné vyčíst z předchozího odstavce glomerulární filtrace je tedy vysoce závislá na krevním tlaku, respektive na tzv. glomerulárním koeficientu (K_f), který je mimo již zmíněného filtračního tlaku určen také velikostí hydraulické permeability a filtrační plochou kapilár. Hodnota tlaku v glomerulárních kapilárách (P_{CG}) je ovlivňována tonem aferentní a eferentní arterioly. Existuje několik mechanismů zajišťujících správný průtok krve ledvinou na základě zachování správného P_{CG} . (11)

Jedním z mechanismů je to, že ledviny podléhají při filtraci autoregulaci, což znamená, že při mírném poklesu či zvýšení středního arteriálního tlaku zůstává průtok krve i glomerulární filtrace stabilní. To je zajištěno dvěma procesy – myogenním

mechanismem, pracujícím na principu reakce buněk hladké svaloviny na napětí cévní stěny, což má za následek vazokonstrikci cévy. Druhým procesem je pak tubuloglomerulární zpětná vazba. Principem této zpětné vazby je, že při vzestupu TK, dojde i ke zvýšení GF, což vede k produkci vazokonstrikční látky juxtaglomerulárním aparát, která způsobí vazokonstrikci aferentní arterioly a následně i pokles průtoku krve ledvinou a tím i pokles GF a TK na původní hodnoty. (5) (8)

3.1.3.2 Úloha ledvin v regulaci vodní a elektrolytové rovnováhy

Jedním z hlavních a velice důležitých úkolů ledvin je udržení vodní a elektrolytové rovnováhy zajištěním konstantního objemu extracelulární tekutiny (OECT).

Regulaci OECT zajišťují mimo jiné ionty, a to především sodík (Na^+) a jeho extracelulární anionty chlorid (Cl^-) a bikarbonát (HCO_3^-) kontrolující osmotické síly v extracelulární tekutině (ECT). Proto jakékoliv výkyvy ve vylučování Na^+ vedou ke změnám ve vylučování vody. Vzhledem k tomu, že za fyziologických podmínek je z filtrovaného množství sodíku denně vyloučeno ledvinami pouze 0,04%, dá se říci, že tubulární reabsorpce sodíku je velice významným mechanismem udržení OECT. Takováto reabsorpce probíhá po celé tubulární části nefronu. (11)

Jedním z mechanismů regulujících OECT prostřednictvím regulace iontové rovnováhy je renin-angiotensinový systém. Dojde-li ke snížení OECT, juxtaglomerulární aparát začne, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, produkovat renin. Renin poté přeměňuje angiotensinogen na angiotensin I (ANG I), který je účinkem angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) přeměňován na angiotenzin II (ANG II). (1)

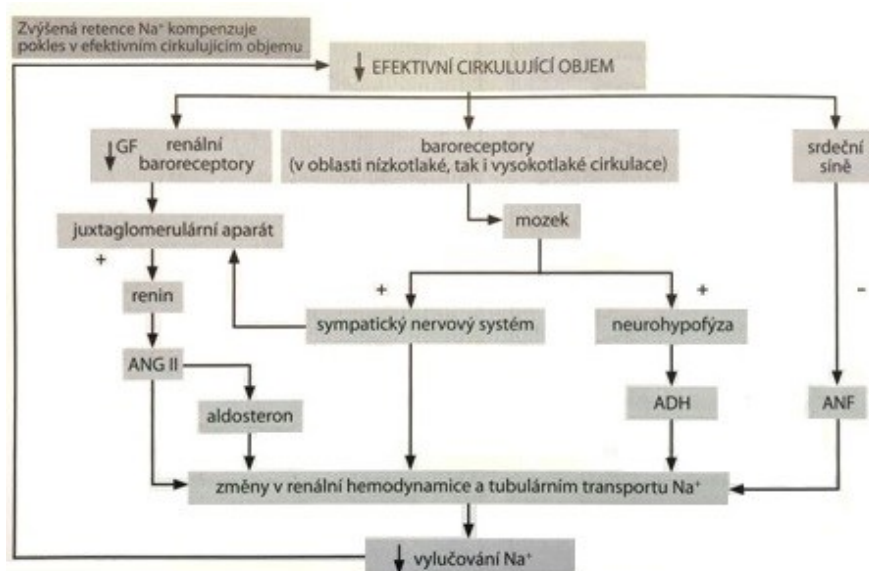
Angiotenzin II spouští několik mechanismů, majících společný cíl, a to normalizaci objemu extracelulární tekutiny. Těmito účinky jsou:

- 1, vazokonstrikce v periferním a renálním řečišti, způsobující zvýšení TK a následné snížení GF, čímž je sníženo i množství filtrovaného Na^+
- 2, přímá reabsorpce sodíku ve všech tubulárních segmentech nefronu
- 3, stimulace sekrece hormonu aldosteronu v kůře nadledvin, jež způsobuje zvýšenou reabsorpci Na^+

4, navození pocitu žízně v hypotalamu a následné uvolnění antidiuretického hormonu (ADH) z neurohypofýzy. Účinkem ADH je zvýšení reabsorpce vody, následkem zvýšení permeability v distálním tubulu. (11)

Jedním z dalších procesů podílejících se na udržení OECT je také vyplavování atriálního natriuretického faktoru (ANF). Na rozdíl od předchozích mechanismů má však jeho vyplavení do krevního řečiště za následek zvýšení vylučování sodíku ledvinami. ANF je vyplavován z myocytů pravé síně srdce následkem roztažení srdečních síní. ANF způsobuje významnou renální vazodilataci a také tlumí reabsorpci Na^+ ve všech částech nefronu.

OECT je však regulován i jinými mechanismy. Mezi tyto mechanismy patří například zvýšená aktivita sympatického nervového systému (SNS). SNS je aktivován baroreceptory při poklesu efektivního cirkulujícího objemu a následně i krevního tlaku. Mezi účinky SNS patří vazokonstrikce, která má za následek snížení GF a tím i snížení vylučování sodíku, nebo také již zmiňovaná sekrece reninu, či zvýšení tubulární reabsorpce sodíku. Nutno dodat, že k aktivaci SNS jakožto mechanismu regulace OECT dochází spíše u stavů spojených s ohrožením života. (11) Reakci organismu na změny OECT je možno vidět na následujícím Obrázku 4.



Obrázek 4 - Schematické znázornění reakce organismu na změny OECT

+ - stimulace systému, - - inhibice systému

(Převzato a upraveno z: (5))

3.1.3.3 Úloha ledvin ve vylučování vody a v tvorbě moči

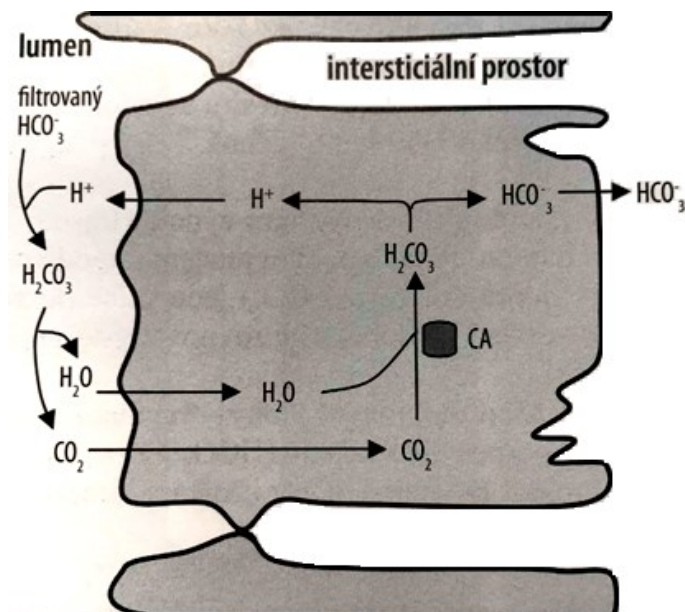
Významnou úlohou ledvin je také očištění krve od nežádoucích látek, solutů či metabolitů, které odcházejí z těla ledvinami s vodou v podobě moči. Ledviny jsou schopny zvýšit či snížit výdej vody tak, aby zůstala zachována stabilní plazmatická osmolalita (přibližně 290 mOsm/l). V závislosti na tom je minimální objem vyloučené maximálně koncentrované moči za den 0,5 l, naopak při tvorbě maximálně zředěné moči může být diuréza až 20 l denně. (5) To jak moc bude konečná moč zředěná či koncentrovaná zajišťuje mimo jiné hladina ADH. V případě sníženého příjmu vody je hladina ADH vysoká, což způsobí vyšší propustnost stěny sběracích kanálků pro vodu, dochází k její reabsorpci a moč se tak stává více koncentrovanou. (11) Na zakoncentrování či zředění moči se podílí také tzv. princip protiproudového násobení, charakterizovaný udržováním trvalého koncentračního gradientu mezi oběma raménky Henleovy kličky. (10) Konkrétní popis tvorby moči byl pak vysvětlen v kapitole 3.1.2 u jednotlivých částí nefronu.

3.1.3.4 Udržování acidobazické rovnováhy

Velice významnou funkcí ledvin je také udržování acidobazické rovnováhy, která je přímo úměrná koncentraci vodíkových iontů (H^+) v těle. pH krve má fyziologicky hodnotu 7,4 a je nutné tuto hodnotu udržet, tedy udržet příjem a výdej vodíkových iontů v rovnováze. V těle jsou dva hlavní producenti tohoto iontu a to: oxidativní metabolismus, při němž vzniká CO_2 a netěkavé kyseliny (konkrétně kyselina sírová a fosforečná). Existují dvě hlavní cesty výdeje H^+ a to plíce, které odstraňují H^+ ve formě CO_2 (respektive ve formě H_2CO_3 poté co H^+ zreaguje s CO_2) a ledviny, které zajišťují tubulární reabsorpci bikarbonátu (HCO_3^-) a vyloučení H^+ .

Vzhledem k tomu, že volný H^+ by vyvolal velké posuny v pH, existuje také ve formě HCO_3^- , který je v této souvislosti tzv. nárazníkovým systémem. Díky tomu, že se HCO_3^- volně filtruje, musí být v zájmu zachování pH také reabsorbován, jinak by došlo k významnému okyselení organismu. Proces reabsorpce filtrovaného HCO_3^- probíhá tak, že v lumen tubulu reaguje HCO_3^- s H^+ za vzniku kyseliny uhličitě (H_2CO_3) za působení enzymu karboanhydrázy. Kyselina uhličitá okamžitě disociuje na H_2O a CO_2 , přičemž CO_2 volně difunduje do buňky, kde vzniká H_2CO_3 , disociující na H^+ a HCO_3^- . HCO_3^- opouští buňku do intersticiálního prostoru, kde difunduje do peritubulárních kapilár a vrací se tak zpět do organismu. Podle momentálního pH krve se tedy zvyšuje

či snižuje vylučování H^+ ledvinami, což je synonymum pro syntézu nového HCO_3^- . (5)
Mechanismus resorpce HCO_3^- v tubulech je znázorněn na následujícím Obrázku 5.



Obrázek 5 - Schematické znázornění mechanismu tubulární resorpce HCO_3^-

(Převzato a upraveno z: (5))

3.1.3.5 Produkce hormonů

Další velice významnou funkcí ledvin je produkce hormonů. Mezi tyto hormony patří renin, který je blíže zmiňován v kapitole 3.1.3.2, dalším z hormonů je pak hormon erythropoetin. Erythropoetin je hormon zajišťující proliferaci a růst červených krvinek, který významně ovlivňuje krvetvorbu. Produkce erythropoetinu v ledvinách se zvyšuje při hypoxii. (2) Spouštěcím regulačním faktorem je tedy nízká saturace krve kyslíkem, která spouští syntézu tzv. renálního erythropoetického faktoru (REF), který následně přeměňuje proerythropoetin na erythropoetin. Erythropoetin zajišťuje stimulaci kmenových buněk, stejně tak i buněk erytrogenese. (11)

Kromě těchto dvou hormonů jsou ledviny schopné syntetizovat také hormon kalcitriol. (5) Tento hormon je zodpovědný za zvýšení resorpce vápníku ve střevech, tvorbu kalmodulinu či za remodelaci kostí a uvolnění vápníku z nich. Dá se tedy říci, že společným znakem těchto jeho účinků je udržení stabilní hladiny vápníku v krvi. (6)

Další hormony syntetizované v ledvinách jsou prostaglandiny a kininy. Obě skupiny hormonů ovlivňují mimo jiné napětí hladké svaloviny cév a účastní se tedy

i řízení průtoku krve ledvinou, ovšem většinou je tomu tak pouze při patologických stavech, například při větších krevních ztrátách. Dá se říci, že prostaglandiny jsou antagonisté angiotensinu II a katecholaminů, neboť úkolem prostaglandinů je tlumit vazokonstrikční účinek těchto hormonů tím, že působí vazodilatačně na *vas afferens* a *efferens*. Prostaglandiny jsou syntetizovány z kyseliny arachidonové jako prekurzoru a stimulem pro jejich vznik je zvýšená hladina angiotensinu II. (6)

3.2 ENDOGLIN A JEHO SOLUBILNÍ FORMA

3.2.1 Endoglin

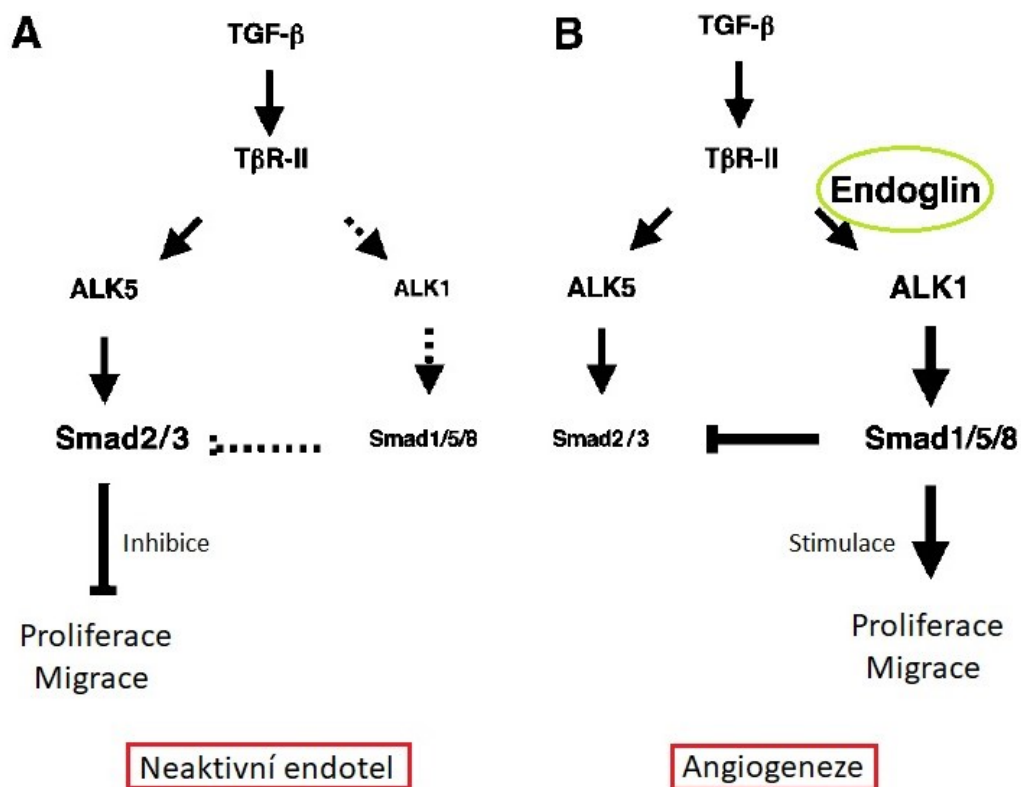
Endoglin je transmembránový glykoprotein, který je součástí receptorového komplexu TGF- β . Jeho buněčná i tkáňová distribuce naznačuje, že hraje významnou roli v cévní homeostáze, angiogenezi a taktéž i v kardiovaskulárním vývoji. (12) (13) Bylo dokonce zjištěno, že myši embrya homozygotní pro mutantní endoglin umírají *in utero* již několik dní *post coitum* v důsledku vaskulárních a srdečních abnormalit, jak dokazuje experiment, ve kterém byly použity modely myši s geneticky navozenou inaktivací endoglinu. (14) Exprese endoglinu je zajišťována z velké části na povrchu endotelových buněk, z menší části pak aktivovanými monocyty/makrofágy, stejně tak jako mezenchymálními buňkami včetně fibroblastů a buněk hladkého svalstva. (13) Další zdroje uvádí, že expresi endoglinu zajišťují též prekuzory červené řady, placentární syncytiotrofoblasty, buňky stromatu (15) či tzv. ECF buňky (endothelial colony-forming cells). (16)

3.2.1.1 Role endoglinu v TGF- β signalizaci

Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, endoglin je součástí komplexu receptorů specifických pro skupinu proteinů zvaných TGF- β . Tato rodina proteinů zahrnuje mimo TGF- β také activin či BMP cytokiny (z anglického bone morphogenic proteins). Samotný TGF- β je multifunkční cytokin zajišťující proliferaci, diferenciaci, migraci a přežití mnoha různých typů buněk. TGF- β hraje také velice významnou roli při angiogenezi, kdy buď inhibuje či stimuluje vývoj cév. U savců jsou známy tři isoformy tohoto cytokinu - TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3, jejichž účinky vysoce závisí na typu dané buňky. Vzhledem k tomu, že je TGF- β prostorově velký, nepřestupuje přes buněčnou membránu do buňky přímo, místo toho se však naváže na receptor na povrchu buněk, který signalizační kaskádou přenáší signál až do buněčného jádra. Přenos signálu zprostředkovává komplex receptorů na povrchu cílových buněk. (17) (18) Tento komplex, mimo již zmíněný endoglin, zahrnuje dvě skupiny proteinů se serin-threonin kinázovou aktivitou. Konkrétně se jedná o receptory typu I (T β RI) a typu II (T β RII). (19) T β RI pak zahrnují takzvané ALK receptory (z anglického activin-like kinase receptors), dále také BMP receptory či activinové receptory. (20)

Přenos signálu probíhá s pomocí hned několika receptorů a signálních molekul, počínaje T β RII, na který se TGF- β naváže. (19) T β RII pak fosforylací aktivuje T β RI, který signál přepośle dál z buněčné membrány do jádra buňky pomocí efektorových molekul, tzv. SMAD molekul. (17) Lidský genom obsahuje geny pro osm SMAD molekul, z nichž pouze pět slouží jako intracelulární efektor v TGF- β receptorovém systému. (21) Ve většině buněk TGF- β aktivuje prostřednictvím vazby s T β RII TGF- β receptor I – typ ALK5, který následně přepośle signál molekulám SMAD2 a SMAD3, tím, že tyto molekuly fosforyluje. V buňkách endotelu však TGF- β spouští kaskádu, při které se aktivují dvě různé cesty přenosu signálu. Jednak již zmíněná ALK5/SMAD2,3, jednak jde o ALK1 indukující fosforylací SMAD1 a SMAD5. Obě cesty přitom mají rozdílnou funkci. První cesta přenosu zahrnující ALK5/SMAD2,3 inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk, přičemž cesta zahrnující ALK1/SMAD1,5 tyto procesy naopak stimuluje. (18)

Endoglin se v této signalizační kaskádě uplatňuje jako přídatný receptor, nazývaný také jako TGF- β receptor III (T β RIII), ačkoliv se přímo neúčastní signalizačního procesu, zastupuje spíše roli modulátoru signalizační kaskády. (22) Role endoglinu je tedy modulovat odpověď buňky právě na TGF- β cytokin. Bylo zjištěno že endoglin je nezbytným komponentem potřebným pro ALK1 cestu signalizace, přičemž stimulace této cesty signalizace zároveň nepřímo inhibuje ALK5 signalizační cestu. V nepřítomnosti endoglinu je však ALK1 signalizační cesta inhibována a endotelové buňky přestávají proliferovat, zatímco ALK5 signalizační cesta je stimulována. Role endoglinu se dá tedy interpretovat jako modulátor rovnováhy mezi TGF- β /ALK1 a TGF- β /ALK5 signalizačními cestami. (18) Působení endoglinu na obě cesty přenosu a jejich dopad na proliferaci a migraci endotelových buněk, je znázorněno na Obrázku 6.



Obrázek 6 - Model regulace angiogeneze endoglinem

(Převzato a upraveno z: (18))

3.2.1.2 Význam endoglinu a TGF- β signalizace

TGF- β signální cesta má tedy významnou roli při embryogenezi i udržování homeostázy v dospělosti. Jedná se především o proces angiogeneze, která je touto signální kaskádou podle požadavků organismu inhibována či stimulována. Při narušení TGF- β signalizace se mohou rozvinout různá onemocnění, počínaje rozvojem nádorového bujení, kdy TGF- β podporuje neovaskularizaci nádorové tkáně. Mutace v TGF- β receptorech, konkrétně v endoglinu nebo ALK1 receptoru, vede k rozvoji onemocnění zvaného hereditární hemoragická telangiektázie (HHT). HHT se projevuje slizniční telangiektázií, tedy strukturální abnormalitou stěn drobných cév a následnou dilatací těchto abnormalit, dále arteriovenózními malformacemi, postihujícími cévy plic, jater či mozku a také krváceními spojenými s těmito cévními lézemi. (17)

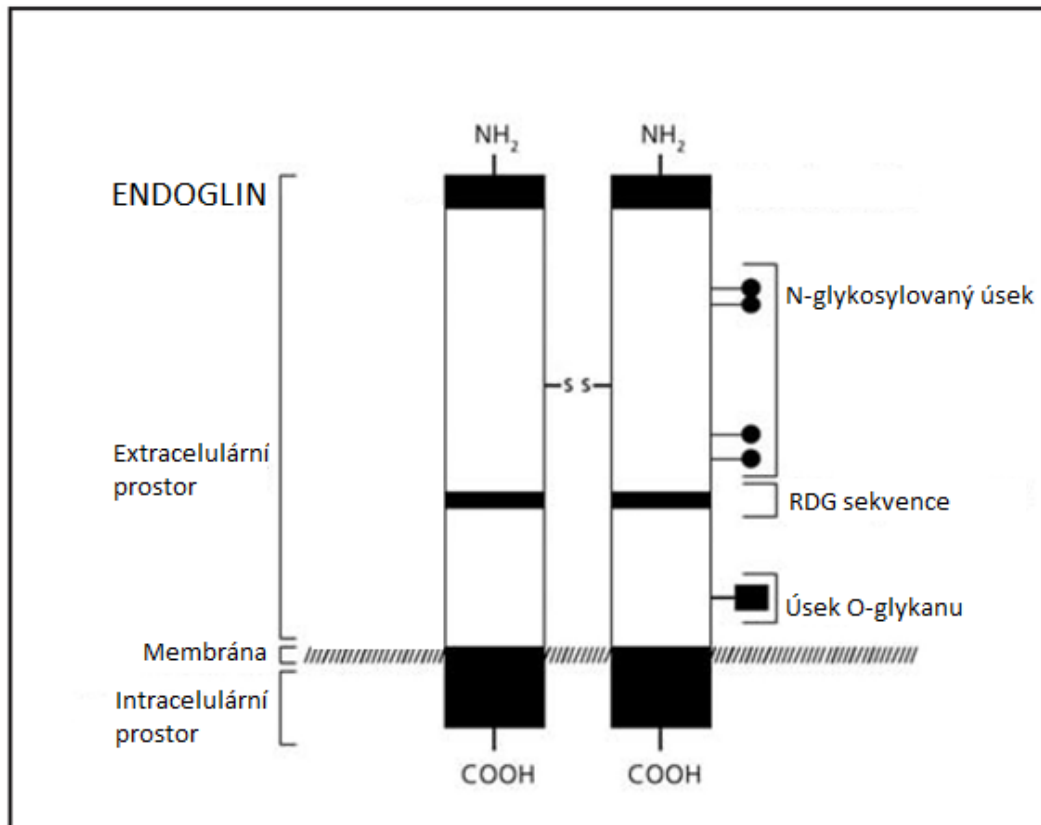
Stejně jako u TGF- β je exprese endoglinu zvýšena v neovaskularizované tkáni, jako je například tkáň tumorová nebo ischemická, a to důsledkem hypoxie. (13) Hojně je endoglin spojován s aterosklerózou. (23) Endoglin je up-regulován také při psoriáze,

sklerodermě nebo poruchách štítné žlázy, kam se řadí Grave-Basedowova choroba či Hashimotova thyreoidita. K up-regulaci dochází také v buňkách hladkého svalstva reagujících na alteraci cévy. (20) Mimo jiné hraje endoglin roli také v metabolických onemocněních jako je například diabetes mellitus či při onemocněních kardiovaskulárního systému, například u preeklampsie či hypertenze. (23) Exprese endoglinu je taktéž zvýšena v buňkách zanícené, poraněné či hojící se tkáně nebo také po ischemii-reperfúzi u ledvin a srdce. (12) Některé zdroje uvádějí zvýšenou expresi endoglinu taktéž u fibrózy ledvin. (24)

3.2.1.3 Struktura

Endoglin je transmembránový protein typu I, jehož molekulová hmotnost je 180 kDa a vyskytuje se ve formě homodimeru vzájemně spojeného disulfidickými vazbami. (22) (25) Oba dimery obsahují extracelulárně uložený tripeptid složený z argininu, glycinu a kyseliny aspartové (tzv. RGD tripeptid) (16), který je znám jako úsek rozpoznávaný mnoha adhezivními proteiny přítomnými v extracelulární matrix (12), jako je například von Willenbrandův faktor, fibrinogen, protrombin či fibronectin. Díky tomu, že tyto molekuly hrají důležitou roli v hemostáze, trombóze či zánětu, lze říci, že přítomnost RDG jasně naznačuje účast endoglinu v těchto procesech. (16) Molekula endoglinu je složena z 561 zbytků aminokyselin tvořících extracelulární doménu a 47 aminokyselinových zbytků tvořících cytoplazmatickou doménu, která je mimo jiné bohatá na aminokyseliny serin a threonin. (25) Strukturálně spadá endoglin do tzv. *zona pellucida* (ZP) rodiny extracelulárních proteinů, které sdílejí společnou ZP doménu sestávající z přibližně 260 aminokyselin a 8 uzavřených cysteinových zbytků. Tato doména, mimo jiné zodpovědná za oligomerizaci endoglinu, je přítomna v mnoha typech extracelulárních proteinů, které díky ní sdílí stejně jako endoglin společné biologické vlastnosti, například to, že všechny tyto proteiny mají také svoji solubilní formu či to, že mají jakožto membránové proteiny hydrofobní sekvenci na C-konci. (15) (20)

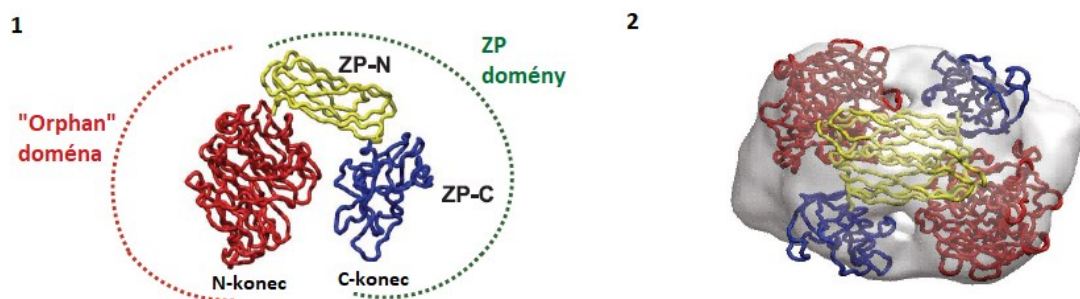
Co se týče primární struktury, kterou můžeme vidět znázorněnou na Obrázku 7, je endoglin glykoproteinem složeným ze čtyř glykosylovaných úseků na N-konci domény a z O-glykanu bohatého na serinové a threoninové zbytky, vyskytujícího se blízko membránové části endoglinu. (26)



Obrázek 7 - Schematicky znázorněná struktura endoglinu

(Převzato a upraveno z: (15))

3D struktura endoglinu, kterou můžeme vidět na Obrázku 8, popsaná na základě elektronové mikroskopie pak říká, že endoglin se formuje do tvaru kupole složené z antiparalelně orientovaných monomerů. (20) Každý monomer se pak skládá ze tří domén zahrnujících dvě ZP domény, pojmenované ZP-N a ZP-C, a jednu tzv. „orphan“ doménu, která se nachází na N-konci molekuly endoglinu. Tyto tři domény jsou jako monomer poskládány do tvaru písmene U. (20) (15)



Obrázek 8 - 3D struktura endoglinu

1- Monomer endoglinu složený ze tří domén, 2- 3D model dimerického endoglinu

(Převzato a upraveno z: (25))

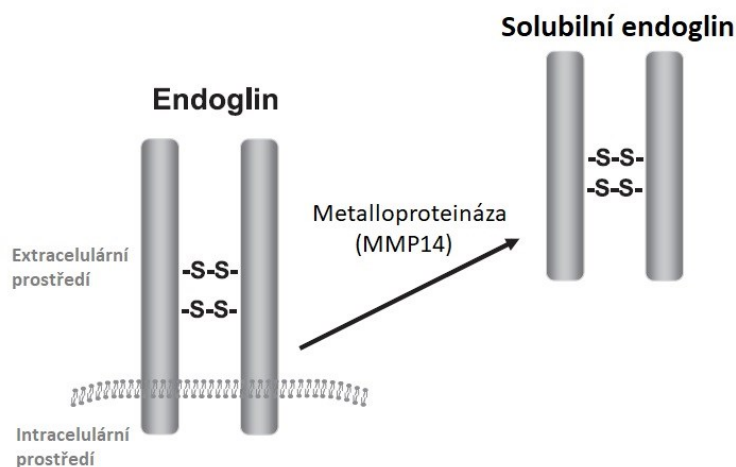
Endoglin má dvě isoformy, dlouhou (L) a krátkou (S). Tyto dvě formy mají extracelulární a transmembránové úseky identické, liší se však od sebe intracelulární cytosolickou částí molekuly složenou z rozdílného počtu aminokyselin. Dlouhá doména obsahuje 47 aminokyselinových zbytků, krátká jen 14. Exprese L-formy významně převyšuje expresi S-formy, dominuje také v buňkách endotelu, zatímco S-forma se vyskytuje spíše v buňkách jater a plic. (22) Obě formy vážou TGF- β , regulace buněčných odpovědí na tento cytokin je však rozdílná. L-forma podporuje spíše ALK1 cestu signalizace, S-forma účinkuje spíše ve prospěch ALK5 signalizační cesty. Experiment s uměle navozenou expresí S-formy endoglinu v endotelu myší svědčí o antiangiogenní aktivitě této formy, jež zapříčinila redukci tumorové tkáně a neovaskularizace u těchto myší. (27) (28)

3.2.2 Solubilní forma endoglinu

Mimo membránový typ endoglinu existuje také jeho cirkulující forma zvaná solubilní endoglin (sEng). sEng má molekulovou hmotnost 80kDa a je vyplavován do krevního oběhu při mnoha okolnostech spojených s poškozením endotelu, se zánětem endotelu či jeho aktivací. (29) (30) Solubilní endoglin je možno detekovat ve zvýšené míře v séru pacientů s preeklampií (30) či kardiovaskulárními onemocněními (KVO), jako je například ateroskleróza (23), diabetes, hypertenze (31) či hypercholesterolemie. (32) Vzhledem k tomu, že jsou tato onemocnění spojená s endotelovou dysfunkcí, vysoká hladina sEng je považována za její biomarker. (33) Molekula solubilního endoglinu je uvolňována z membránově vázaného endoglinu na pozici 586 působením proteolytického enzymu matrix metalloproteinázy 14 (MMP14). (34) (35) Místo odštěpnutí naznačuje, že cirkulující forma endoglinu je ve skutečnosti celá extracelulární část membránově vázaného endoglinu, tedy její N-konec. (30)

3.2.2.1 Vznik sEng

MMP14 je enzymem odštěpujícím sEng z membránově vázaného Eng a zároveň matrix metalloproteinázou s největší expresí v endotelových buňkách. Řízeným snížením exprese tohoto enzymu pak dochází ke snížení hladiny solubilního endoglinu. MMP14 je zároveň hlavním aktivátorem matrix metalloproteinázy 2 (MMP2) a matrix metalloproteinázy 13 (MMP13), díky čemuž hraje důležitou roli ve formování cév při angiogenezi. Exprese MMP14 probíhá ve vysoké míře v epitelových či endotelových buňkách. (36) Vznik sEng pomocí MMP14 můžeme vidět na následujícím Obrázku 9.



Obrázek 9 - Vznik solubilního endoglinu proteolytickým štěpením membránově vázaného endoglinu

(Převzato a upraveno z: (12))

Ačkoliv někteří autoři tvrdí, že je MMP14 hlavním enzymem podílejícím se na tvorbě sEng odštěpením z membránového Eng (36), jiní toto tvrzení ve svých člancích vyvracejí, odkazujíc přitom na svoji práci, ve které účinkem oxysterolů, které nepřímo zvyšují expresi MMP14, ke zvýšení exprese sEng *in vitro* nedošlo. (37) MMP14 jakožto enzym štěpící membránový endoglin zůstává tedy stále předmětem zkoumání.

3.2.2.2 Důsledky působení sEng

Solubilní endoglin patří mezi molekuly s antiangiogenním efektem. Jeho účinek spočívá v navázání cirkulujícího TGF- β , čímž pozastavuje TGF- β signalizační kaskádu a tím i proliferaci endotelových buněk. sEng pravděpodobně inhibuje efekt tohoto cytokinu pouze lokálně, a to v místech, kde je molekula TGF- β aktivovaná, tedy nenavázaná na TGF- β vazací proteiny. sEng navázáním TGF- β tedy nijak neovlivňuje koncentraci této molekuly v neaktivní formě a minimálně ovlivňuje koncentraci celkového cirkulujícího TGF- β . (30)

Experimenty dokazují, že molekula je schopna narušit formování endotelu cév *in vitro* a *in vivo* zvýšit permeabilitu cév a navodit hypertenzi. Tento účinek je pravděpodobně způsoben schopností sEng pozastavovat TGF- β signalizaci vyvázáním cirkulujícího TGF- β , jenž je mimo jiné schopný navodit vazodilataci cév aktivací endotelové NO syntázy (eNOS). (30) Studie vypovídají, že molekula oxidu dusnatého (NO), produkovaná právě eNOS (38), hraje důležitou roli při vzniku hypertenze a jejíž snížená biologická dostupnost je klíčovým faktorem v patogenezi preeklampsie, aterosklerózy a dalších onemocnění. (30)

3.2.2.3 sEng v souvislosti s onemocněními

Solubilní endoglin placentárního původu se vyskytuje ve zvýšené míře v séru žen s preeklampsií, což je závažný stav vyskytující se v těhotenství, jež je hlavní příčinou úmrtí matek, plodu i novorozence ve vyspělých zemích. Je charakterizován hypertenzí a proteinurií ve třetím trimestru těhotenství a může se také rozvinout v HELLP syndrom, záchvaty (eklampsie) či omezení vývoje plodu. Klinicky se preeklampsie manifestuje endotelovou dysfunkcí ústící ve vazokonstrikci a ischemii některých orgánů či zvýšenou permeabilitou cév. (30) Kromě sEng stojí za patogenezi i další protein zvaný sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1), známý také jako VEGF receptor 1, jehož úkolem je neutralizovat proangiogenní účinky VEGF (vascular endothelial growth

factor) a PIGF (placental growth factor) jejich vyvázáním. VEGF je schopný, stejně jako TGF- β , aktivovat eNOS a tím nepřímo způsobit vasodilataci. (30) sEng a sFlt1 působí vzájemně synergisticky a znásobují svůj účinek. Jejich vysoké hladiny zároveň korelují se závažností onemocnění, proto mohou být potenciálně využity jako jeho biomarker. (30) (37) sEng je v případě preeklampsie uvolňován na základě děložní ischemie či hypoxie. (39) Zvýšené hladiny sEng stejně jako sFlt1 jsou tedy velice pravděpodobně zodpovědné za hypertenzi a permeabilitu cév, jakožto symptomů preeklampsie. Jedna z hypotéz hovoří o nadměrné produkci sEng placentou v těhotenství jakožto kompenzatorním mechanismu efektu membránově vázaného endoglinu. (30) Potenciální terapie spočívá v inhibici MMP14, jakožto enzymu uvolňujícího sEng do cirkulace, například použitím protilátek proti MMP14. (36) Některé studie však dokazují, že sEng působící při patogenezi preeklampsie je štěpen jiným způsobem než je tomu přirozeně. Jeho štěpení se pravděpodobně účastní jiný typ metalloproteinázy než MMP14, takový, který membránový Eng neštěpí na pozici 586 jako u přirozené formy sEng. K těmto poznatkům přispěl vznik rekombinantního sEng, vzniklého z tzv. Eng1-586, jak je označován konstrukt odštěpený z membránového Eng na pozici 586. Tento rekombinantní sEng mající molekulovou hmotnost 80kDa byl porovnán se sEng vyskytující se v séru pacientek s preeklampsií, který má molekulovou hmotnost 65kDa. To naznačuje, že typ sEng působící při patogenezi preeklampsie je pro toto onemocnění specifický. (35)

Další skupinou onemocnění, kde solubilní endoglin hraje velice důležitou roli, jsou onemocnění kardiovaskulárního systému. Byla prokázána pozitivní korelace mezi hladinou sEng a hladinou glykémie u diabetiků, i mezi hladinou sEng a hladinou glykovaného hemoglobinu, také u diabetiků. Ke stejné korelaci dochází i mezi hodnotou krevního tlaku a hladinou sEng u pacientů s hypertenzí i u pacientů trpících hypertenzí a zároveň diabetem. Byla také prověřována korelace mezi endotelovou dysfunkcí a hladinou sEng, přičemž endotelová dysfunkce byla měřena analýzou ukazatele PWV (pulse wave velocity) indikující arteriální ztuhlost. Experiment byl proveden u pacientů s hypertenzí a diabetem a korelace mezi těmito dvěma ukazateli byla taktéž pozitivní. (31) Tuto hypotézu podporují i další studie, zaměřující se na vysoké hladiny sEng kombinované s dlouhodobou hypercholesterolemií, vyúsťující ve zhoršení dysfunkce endotelu v aortě s možným narušením signalizace závislé na eNOS a membránovém endoglinu. Je tedy nasnadě vnímat sEng ne jen jako biomarker kardiovaskulárních

onemocnění, ale také jako jejich možný ko-induktor, pokud působí v kombinaci s jinými rizikovými faktory KVO. (40) Prokázána byla také shoda mezi vysokou hladinou solubilního endoglinu a aterosklerózou, která je pravděpodobně, stejně jako předchozí jmenovaná onemocnění, zapříčiněna rozvojem endotelové dysfunkce. Ta vzniká pravděpodobně na základě inhibice TGF- β signalizace v důsledku vychytávání TGF- β solubilním endoglinem. Endotelová dysfunkce se projevuje stavem, kdy endotel ztrácí své přirozené vlastnosti a směřuje více k vazokonstrikčnímu, protrombotickému a prozánětlivému stavu. Příčinou endotelové dysfunkce je narušená biologická dostupnost NO zapříčiněná jeho sníženou syntézou eNOS. Nutné je však pamatovat na to, že zvýšená hladina sEng při určitých stavech či onemocněních nemusí značit jeho zapojení v patogenezi těchto onemocnění a může sloužit spíše jako biomarker vývoje těchto kardiovaskulárních onemocnění. (31)

Bylo popsáno využití sEng právě jako potenciálního biomarkeru při léčbě pacientů trpících familiární hypercholesterolémií (FH) pomocí extrakorporální eliminace LDL (low density lipoprotein) cholesterolu aferézou. Jde o efektivní terapii využívanou u pacientů s homozygotní či závažnou heterozygotní formou FH, u nichž je jakákoliv jiná léčba neúspěšná. Nevýhodou je však její časté opakování na pravidelné bázi. Proto je vyvíjena snaha o nalezení vhodného biochemického markeru schopného determinovat nezbytnou intenzitu a frekvenci eliminace LDL cholesterolu touto metodou. Mělo by se jednat o agens vyskytující se v séru, jehož hodnoty korelují s postupem onemocnění a odráží jeho zlepšení po eliminační terapii. Takovýmto markerem by mohl být právě sEng, který se spolu s von Willenbrandovým faktorem zvyšuje v séru u pacientů trpících aterosklerózou, onemocněním způsobeným nadbytečným ukládáním LDL cholesterolu v endotelu cév. Dle studie prof. Bláhy a kol. byl sEng před eliminační terapií u pacientů s FH významně zvýšen, v porovnání s kontrolní skupinou pacientů bez FH, avšak jeho koncentrace po této terapii signifikantně klesla, přestože nebyla zaznamenána korelace se snížením LDL-cholesterolu. To však může být způsobeno tzv. pleiotropním efektem tohoto druhu léčby. Solubilní endoglin se dle těchto výsledků jeví jako slibný biomarker léčby FH pomocí eliminační aferézy LDL cholesterolu. Takováto dlouhodobá terapie prováděná sníženými hladinami sEng by mohla sloužit k odvrácení aterogenního procesu a k nápravě endotelového poškození snížením hladin LDL cholesterolu. (41) (32)

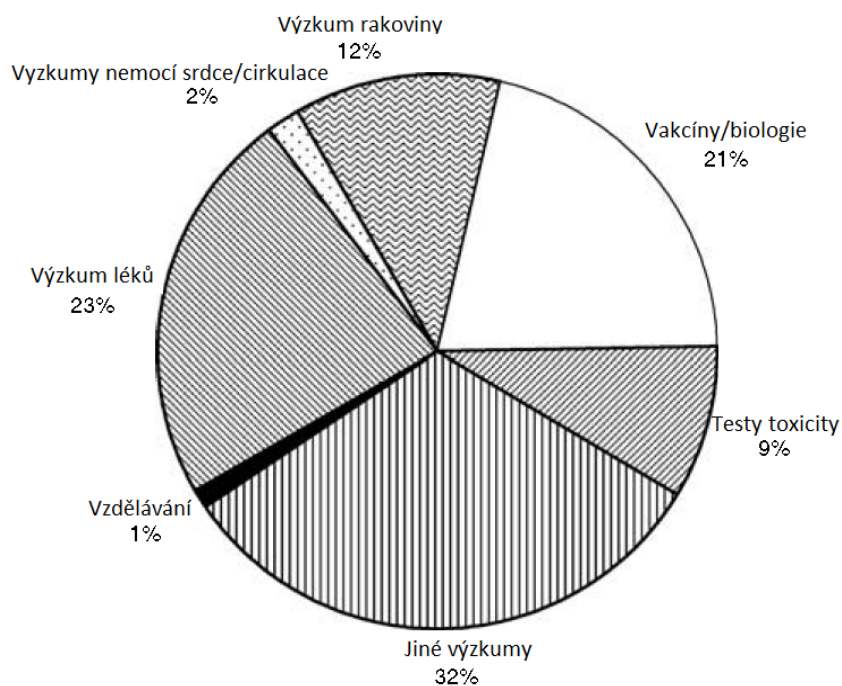
Přesná role sEng v malignitách zůstává ne zcela jasná. Některé studie dokazují zvýšenou hladinu u pacientů trpících rakovinou, jiné studie však u takovýchto pacientů nezaznamenávají žádné zvýšení hladiny sEng. Na druhou stranu, výsledky u některých pacientů s kolorektálním karcinomem podporují antiangiogenní roli solubilního endoglinu, díky snížené hladině sEng u těchto pacientů, což naznačuje vyšší angiogenní aktivitu. Obecně se však hladiny sEng v cirkulaci nijak významně nemění, proto není vhodné použití sEng jakožto biomarkeru u pacientů trpících karcinomy. Přesto, lokální negativní regulace tvorby sEng pomocí MMP14 může vyústit v podstatné změny v hladinách sEng v místě tumoru a díky tomu mít silnější vliv na proangiogenní potenciál endotelových buněk asociovaných s tumorem. Lokální pozitivní regulace exprese MMP14 totiž způsobuje zvýšení sEng za současného snížení membránového Eng, čímž dojde ke snížení angiogeneze. Z výše zmíněného tedy vyplývá, že sEng hraje velice důležitou roli v regulaci angiogeneze tumorů. Teoreticky by proto podávání sEng mohlo mít terapeutický efekt využívaný při léčbě angiogeneze spojené s nádorovým bujením. (36)

3.3 ZVÍŘECÍ MODELY

Experimenty prováděné na zvířatech jsou v dnešní době nezbytným nástrojem pro pochopení patogeneze určitých nemocí, pro testování nových léčiv, výrobu vakcín a dalších biologických agens, obecně nástrojem potřebným pro rozvoj medicíny. Zvířata jsou využívána pro experimenty *in vivo*, ale i pro experimenty *in vitro*, kdy slouží jako zdroj buněk či tkání, které jsou pak k samotnému pokusu využívány. Organismus člověka je v jistých věcech velice podobný organismu zvířat, základní podobností je stejná sada orgánů, které fungují stejným způsobem jako ty lidské. To je důvod, pro který jsou laboratorní zvířata používána k vědeckým experimentům a zároveň důvod, proč je výsledky těchto experimentů většinou možné aplikovat na člověka. (42) (43)

Zvířata byla pro vědecké a medicínské účely používána již od dob starověkého Řecka, a už Aristoteles s Hippokratem využívali pitev zvířat jakožto nástroje pro získání jejich znalostí o struktuře a funkci lidského těla. I Galén ve svých experimentech, jenž poskytly základy pro lékařské zákroky prováděné po mnoho nadcházejících staletí, využíval prasata, opice či psy. Avšak až v pozdějších dobách se začaly vést debaty o morální stránce využití zvířat pro experimentální účely. S objevem anestezie a uvedením Darwinova díla *O původu druhů* následovaným vydáním tzv. Kochových postulátů počty zvířat používaných pro vědecké účely ještě vzrostly, což podpořil i rozvoj oborů jako je farmakologie, toxikologie či imunologie. Od 80. let 20. století však začaly tyto počty klesat, pravděpodobně na základě veřejného povědomí, rozvoje etických komisí a legislativy týkající se využití zvířat. V posledních letech se však zvířata využívají v čím dál větší míře převážně následkem rozvoje geneticky upravených zvířat. (44)

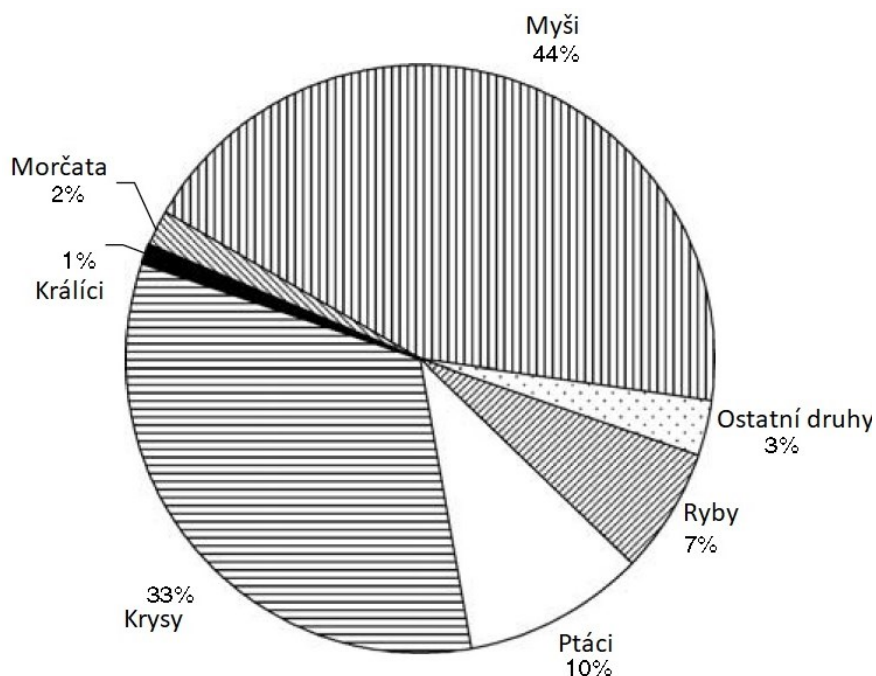
V každém experimentu je mimo zvířat spadajících do pokusné skupiny využíváno také tzv. kontrolní skupiny. Tyto dvě skupiny zvířat se od sebe vzájemně liší pouze v jedné veličině (např. patologická změna), ostatní faktory zůstávají stejné (např.: teplota, ve které jsou zvířata chována, dieta, atd.). (43) V dnešní době je každým rokem využíváno na 75-100 milionů obratlovců za účelem výzkumu a testování. Rozdělení dle jednotlivých oborů je vyobrazeno v Grafu č. 1. (44)



Graf 1 - Využití zvířat při experimentech rozdělené dle účelu

(Převzato a upraveno: (44))

Ze všech zvířat jsou pak k vědeckým účelům nejhojněji využívány krysy a myši. Druhy a zastoupení laboratorních zvířat je možno vidět na Grafu 2.



Graf 2 - Grafické znázornění zastoupení jednotlivých zvířecích druhů používaných v laboratoři

(Převzato a upraveno z: (44))

3.3.1 Důvody použití

Mnoho zvířat je využíváno jako cenný nástroj při studiu nemocí ohrožujících jak lidskou, tak zvířecí populaci. Laboratorní zvířata jsou využívána k biomedicínským výzkumům z následujících důvodů.

Proveditelnost - Zvířata používaná v experimentech vyžadují relativně málo péče - od prostředí, ve kterém jsou chována až po zajištění potravy, kterou jsou krmena. Díky tomu je zevní prostředí, jakožto faktor působící na subjekty relativně ustálený. Výhodou je také kratší životní cyklus zvířat, který nám umožňuje studovat jednoho jedince od jeho narození až do smrti.

Podobnost člověku – Svou anatomii či fyziologickými funkcemi se spousta zvířat člověku podobá, což je pro studium onemocnění u člověka více než vhodné. Například s myší domácí sdílí člověk 98% genomu.

Testování léčiv – Laboratorní zvířata jsou často také nástrojem k testování léčiv předtím, než jsou schválena ke klinických studiích u člověka. Používají se v preklinických zkouškách k zjištění toxicity, farmakodynamiky či farmakokinetiky daných léků. (45)

Přes všechny tyto důvody však stoupá povědomí o omezeních spojených s použitím laboratorních zvířat ve výzkumu. Zvláště se diskutuje o možné neschopnosti dosáhnout důvěryhodných výsledků při zkoumání stavů spojených s lidským zdravím. Například informace tvrdící, že devět z deseti léků, které se jeví slibně ve studiích na zvířatech, selže při klinických zkouškách u člověka, tento názor jen podporuje. (42)

O stejné problematice hovoří i jiní autoři, kteří zdůrazňují, že důvěryhodnost experimentů provedených na zvířatech nemůže být zaručena, jak dokazují některé předešlé výzkumy. Výsledky, kterých bylo dosaženo u zvířat, nelze tedy vždy zcela přenést na člověka i přes několik sérií opakování daného pokusu. (44)

3.3.2 Výhody a nevýhody využití pokusných zvířat

V Tabulce 1 jsou uvedeny výhody a nevýhody použití laboratorních zvířat jakožto experimentálních subjektů.

VÝHODY	NEVÝHODY
Možnost získat biologický materiál ze všech orgánů	Druhová odlišnost lidí a použitých zvířat (hůře reprodukovatelné výsledky)
Možnost naplánování a přípravy pokusu	Časté malé množství získaného biologického materiálu (především krve)
Kratší životní cyklus jedné generace	Finanční náročnost při ponechání zvířat v experimentu po delší dobu
Možnost hodnotit důsledek odlišného parametru na zdravotní stav zvířat	Pokusy podléhají kontrolám etických norem

Tabulka 1 - Výhody a nevýhody použití zvířecích modelů

(Tabulka převzata a upravena z: (43))

3.3.3 Teorie 3 R

Při práci s laboratorními zvířaty je nutné dodržovat určité postupy, které mají subjektům poskytnout, pokud možno, co nejmenší diskomfort. K tomu slouží teorie 3R vypracovaná Russellem a Brunchem v 60. letech minulého století považovaná za jakousi etickou normu při práci s laboratorními zvířaty.

První R – *replacement* – tedy náhrada, v praxi se vykládá tak, že pokud existují jiné metody, například použití bezobratlých či *in vitro* metod, je doporučeno jich využít. Přesto, že takovéto metody mohou být finančně náročnější.

Druhé R – *refinement* - v překladu „zjemnění“ daného experimentu. V případě použití laboratorních zvířat jde o provedení pokusu ve snaze co nejméně ublížit či uškodit daným subjektům. Jde o provedení pouze nezbytných zákroků, pokud jsou tyto zákroky stresující, provést je v celkové anestezii, pooperačně používat analgetika, atd.

Třetí R – *reduction* - neboli redukce, tedy snížení počtu použitých subjektů na absolutně nezbytné minimum. (43) (46)

3.3.4 Genetika laboratorních zvířat

V zařízeních pro chov laboratorních zvířat je běžné nechat mezi sebou pářit bratra a sestru, pokud se sourozenci takto kříží po 20 generací, vznikne tzv. inbrední kmen. Vlastností jedinců tohoto kmene je, že mají všichni stejnou genetickou výbavu, což je při pokusech často vyžadováno. Naopak pro zachování různorodosti genetické výbavy se nechávají křížit jedinci zcela nepříbuzní, vzniká tzv. outbrední kmen.

Znám je také tzv. knock-out mutantní kmen, jež vzniká genetickou manipulací. S geny je možno manipulovat buď ve fázi oocyty nebo selektováním nediferencovaných buněk s defektem a jejich vrácením zpět do blastocytu. Je možné také vytvořit modifikovaný transgenní kmen a to přenosem cizího genu do zygoty kmene. (43)

Geneticky modifikovaná zvířata se při laboratorních pokusech zvláště v posledních letech dostávají do popředí. Aplikace genetického inženýrství umožnila vytvořit nové modely lidských nemocí, jejichž vlastnosti zvířecí modely dříve postrádaly. Vývoj nových a vylepšených modelů nabízí mnoho výhod nad těmi existujícími, čímž se zlepšuje i kvalita provedených pokusů. (47)

Chov takto geneticky upravených jedinců probíhá pod přísnou kontrolou v zařízeních tomu určených a je upraven zákonem. (43)

I přes to, že použití zvířat k vědeckým či experimentálním účelům bylo vždy terčem kritiky, která se zaměřovala jak na etickou stránku věci, tak na spolehlivost údajů získaných při experimentech, je nepochybné, že experimenty prováděné na zvířatech mají pro člověka obrovskou hodnotu. Data získaná při těchto pokusech nám poskytují určitý náhled biologického modelu, předtím než dojde k jeho aplikaci u člověka. (44) (48)

3.3.5 Model myši s vysokou hladinou sEng

Model myši s vysokou hladinou solubilního endoglinu se v laboratořích používá z mnoha důvodů. Nejčastěji jde o studium onemocnění spojených právě se sEng, jako je například ateroskleróza (49), endotelová dysfunkce (40) nebo hypertenze (50)

Pro vytvoření transgenního modelu myši exprimující vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu, tzv. sEng⁺ myši, se do oplodněných vajíček myši kmene CBAxC57BL/6J vpravuje mikroinjekcí zkrácený endoglinový konstrukt (aminokyseliny 26-437) řízený aktinovým promotorem. Tyto myši se vyznačují hypertenzí, malou velikostí mláďat, proteinurií a poškozením ledvin. (50)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA

Při experimentu byly použity transgenní myši s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu, tzv. sEng⁺ model, na pozadí kmene CBAxC57BL/6J. Experiment zahrnoval 5 samců a 6 samic ve skupině sEng⁺ ve věku dvanácti měsíců a stejně staré myši kontrolní skupiny transgenního modelu exprimující nízké hladiny sEng, ze které bylo použito 5 samců a 5 samic. Zvířata byla chována za standardních laboratorních podmínek, v místnosti s kontrolovanou teplotou a vlhkostí, při dvanáctihodinovém cyklu střídání světla a tmy. Byla krmena standardní laboratorní tzv. chow dietou, zároveň měla volný přístup k vodě i potravě.

Všechny experimenty byly provedeny ve shodě s EEC (86/609/EEC).

Po skončení experimentu byla zvířata usmrcena v hluboké narkóze. Po usmrcení byly zvířatům odebrány ledviny určené pro další histologické zpracování.

4.2 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ

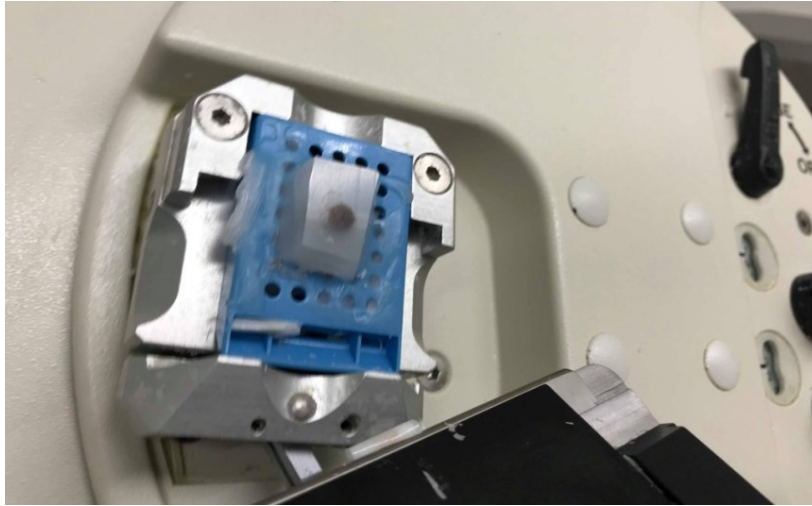
Odebrané ledviny byly fixovány tři dny ve 4% formaldehydu při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky zpracovány v autotechnikonu Leica, který slouží k proplachu tkáně v sérii rozpouštědel a prosycení parafínem. Konkrétně se tkáň proplachuje nejprve v nízkoprocentních alkoholech, poté v rozpouštědlech se zvyšujícím se obsahem alkoholu, v acetonu a nakonec v xylenu. Autotechnikon Leica je možné vidět na následujícím Obrázku 10.



Obrázek 10 – Autotechnikon Leica

(Zdroj: autor)

Po takovémto proplachu se tkáň ponechala 2-6 hodin v tekutém parafínu a poté se zalila do parafínových bločků. Parafínové bločky se následně na automatickém mikrotomu značky Leica DSC1 nakrájely na řezy o tloušťce 7 μm , které byly převedeny na podložní sklíčka potažená želatinou, která slouží pro lepší adhezi řezů ke sklíčku. Bloček uchycený v automatickém mikrotomu je zobrazený na Obrázku 11.



Obrázek 11 - Parafinový bloček uchycený v automatickém mikrotomu

(Zdroj: autor)

Následovalo 48 hodin sušení v termostatu při 37°C. Poté se sklíčka odparafinovala v sérii lázní složené z xylenu a odvodnila sestupnou řadou alkoholů s klesající koncentrací až do destilované vody. Po odparafinování se jeden z řezů barvil hematoxylinem-eosinem, druhý zeleným trichromem. Po barvení se řezy odvodňovaly vzestupnou alkoholovou řadou, projasnily xylenem a následně zamontovaly montovacím médiem (Eukitt, Sigma-Aldrich, USA). Fázi montování je možné vidět na následujícím Obrázku 12.



Obrázek 12 - Montování obarvených preparátů

(Zdroj: autor)

4.2.1 Barvení preparátů

K odlišení jednotlivých struktur tkáně při pozorování světelným mikroskopem slouží barvení histologických řezů. U preparátů nebarvených histologickými barvivy nelze jednotlivé tkáňové struktury při mikroskopování světelným mikroskopem rozeznat díky tomu, že lomivost světla těchto struktur se téměř neliší. Po obarvení řezů se však na různé části buňky naváží různá barviva a tyto části mohou být tímto rozeznávány. (51)

4.2.1.1 Barvení hematoxylinem-eosinem

Barvení hematoxylinem-eosinem (H-E) se zařazuje do skupiny základních přehledných barvení a slouží k orientačnímu odlišení dané tkáně.

Hematoxylin patří mezi bazická barviva a získává se ve formě prášku rozpustného v etanolu nebo vodě. Tento prášek sám o sobě nedisponuje barvicí schopností, aby ji získal, musí hematoxylin zoxidovat na tzv. hematein. Takovéto oxidace je dosaženo přidáním oxidačních činidel, například jodičnanu sodného či draselného. Hemateinový roztok je však nestálý, proto je nutné zajistit jeho stabilitu a to přidáním mořidla – kamence. Po přidání mořidla dojde ke vzniku tzv. barevného laku hemateinu, který je ve formě roztoku připraven k barvení. Hematoxylin zobrazuje struktury buněčného jádra, které barví modrou až fialovou barvou.

Eosin se řadí do skupiny kyselých barviv a v buňce barví zpravidla cytoplasmu růžovou až červenou barvou. V laboratořích se používá několik druhů, nejčastěji jde o žlutý eosin. (51)

Příprava roztoku hematoxylinu:

Gillův hematoxylin:

hematoxylin	4,0 g
jodičnan sodný	0,4 g
síran hlinitý	35,2 g
destilovaná voda	710 ml
etylenglykol	250 ml
kyselina octová	40 ml

První tři složky se, každá zvlášť, nechají rozpustit v destilované vodě, poté se přidá dané množství etylenglykolu a následně ledová kyselina octová. Ze zadaného množství vzniká 1000 ml roztoku hematoxylinu.

Eosin

eosin	10 g
dichroman draselný	5g
destilovaná voda	800 ml
nasycený roztok k. pikrové	100 ml
absolutní etanol čistý	100 ml

Eosin a dichroman se nechají rozpustit v destilované vodě, poté se přidá nasycený roztok kyseliny pikrové a za stálého míchání se po kapkách přidá i etanol. Ze zadaného množství vznikne 1000 ml roztoku.

Diferenciační roztok

70 % alkohol	100 ml
kyselý alkohol	100 ml

Postup barvení:

Nejprve se řezy odparafinují v xylenové lázni třikrát po pěti minutách, poté se na pět minut ponoří do 96% alkoholu, poté do 70% alkoholu také na pět minut. Následně se ponoří do destilované vody po dobu pěti minut. Dalším krokem je vlastní barvení, zahrnující čtyři minuty v hematoxylinu, následné opláchnutí v diferenciační lázni a opláchnutí tekoucí vodou. Tento krok se nazývá modření. Po modření se preparáty na čtyři vteřiny ponoří do roztoku eosinu. Řezy se poté oplachují destilovanou vodou, odvodňují vzestupnou alkoholovou řadu, projasní xylenem a nakonec montují montovacím médiem.

Výsledek barvení:

Při dodržení postupu barvení se v ideálním případě pod mikroskopem zobrazují jádra buněk a chrupavka modře, kolagenní vazivo růžově a svalovina červeně.

4.2.1.2 Zelený trichrom

Zelený trichrom je barvivo používané k zobrazení kolagenního vaziva pod mikroskopem. Barvení patří mezi základní barvicí techniky a spolu s barvením žlutým a modrým trichromem se řadí mezi tzv. barvení Massonovými trichromy. (51)

Příprava roztoků:

Celé barvení se provádí třemi barvicími roztoky, používá se roztok Goldner I, Goldner II a Goldner III.

Goldner I:

A,	barvivo Ponceu de xylidin	1 g	
	koncentrovaná kyselina octová	1 ml	60 ml
	destilovaná voda	100 ml	
			+
B,	barvivo oranž G	1 g	
	koncentrovaná kyselina octová	1 ml	30 ml
	destilovaná voda	100 ml	
			+
C,	barvivo Fuchsin S	1 ml	
	koncentrovaná kyselina octová	1 ml	30 ml
	destilovaná voda	100 ml	

Goldner II

1% vodný roztok kyseliny fosfowolframové (15 ml do 150 ml destilované vody)

Goldner III

barvivo světlá zeleň	1,5 g
ledová kyselina octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

Postup barvení:

Prvním krokem je opět odparafinování řezů, které probíhá stejně jako u barvení H-E. Po odparafinování se řezy barví v hematoxylinu po dobu 3-5 minut a opláchnou v destilované vodě. Poté se preparáty opláchnou v 70% alkoholu a nechávají diferencovat v kyselém alkoholu. Dalším krokem je modření pod slabým proudem tekoucí vody. Po tomto kroku následuje samotné barvení – nejprve 10 minut v roztoku Goldner I, poté 10 minut v roztoku Goldner II a nakonec 10 minut v roztoku Goldner III. Na závěr se řezy odvodňují, projasňují xylenem a montují.

Výsledek barvení:

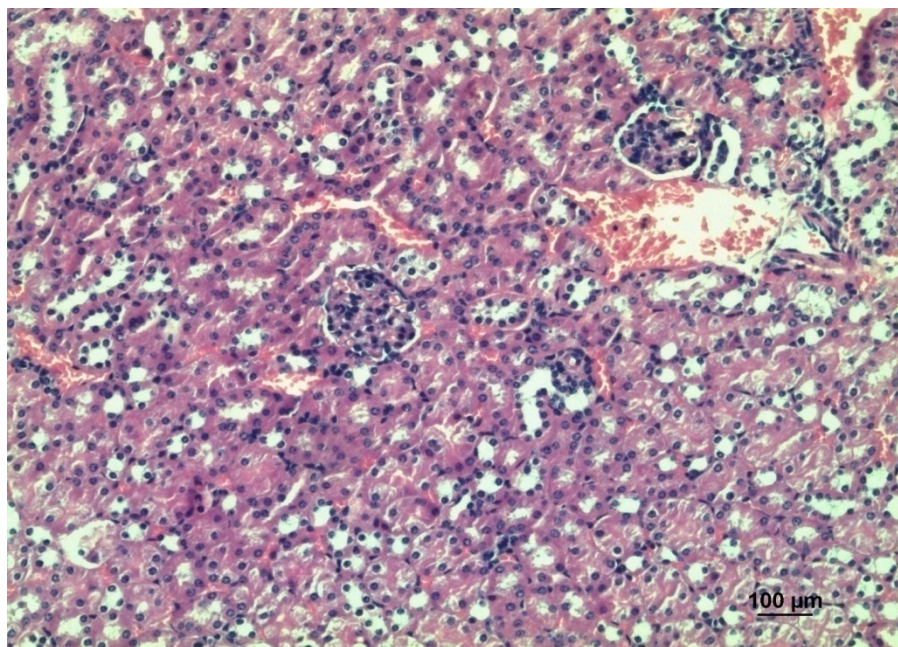
Při dodržení všech kroků postupu, by správně nabarvené preparáty měly pod mikroskopem zobrazovat kolagenní vazivo zeleně, svalovinu cihlově červeně, jádra modře, erythrocyty oranžově a hyalinní vazivo červeně.

4.3 FOTODOKUMENTACE PREPARÁTŮ

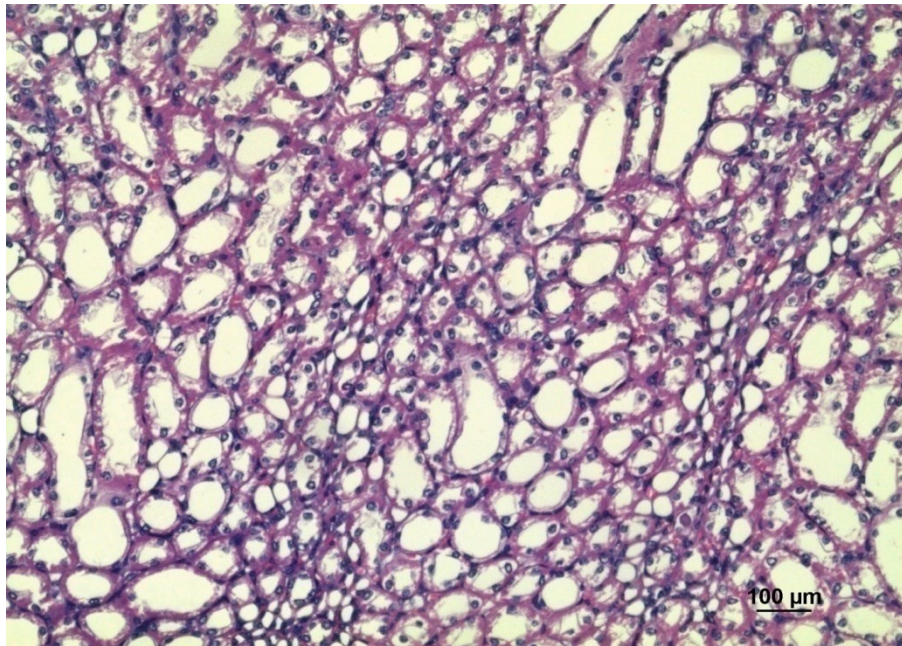
Fotodokumentace byla vyhotovena použitím mikroskopu Olympus AX 70 (Olympus, Česká republika) s digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corporation, Kanada) a softwarem obrazové analýzy NIS-Elements, verze 4.0 (Laboratory Imaging, Česká republika).

5 VÝSLEDKY

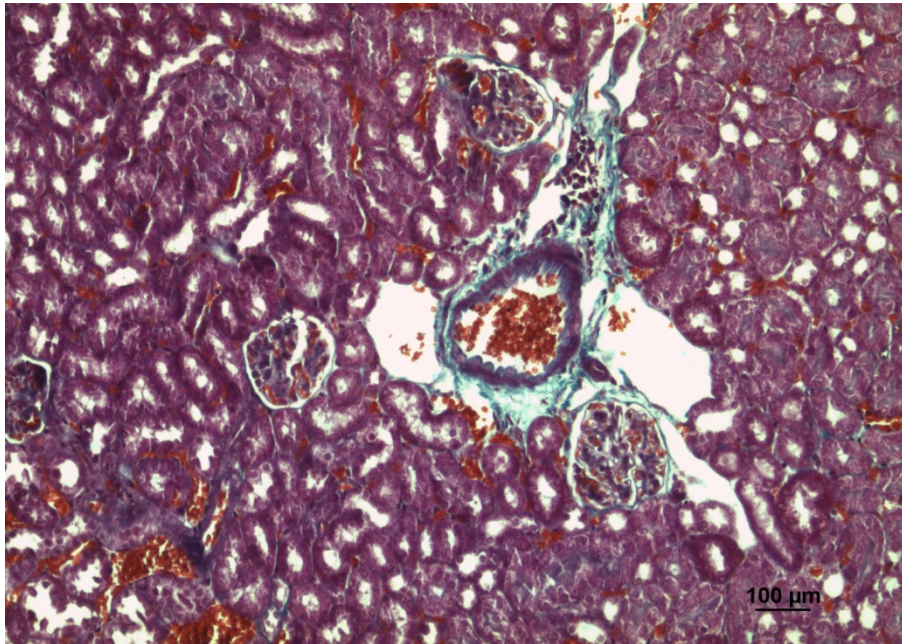
Při mikroskopickém zhodnocení a porovnávání preparátů ledvin myši s vysokou hladinou lidského sEng a ledvin myši z kontrolní skupiny, barvených hematoxylinem-eosinem, jsme pozorovali výskyt hyalinu ve sběracích kanálcích ve dřeni ledvin samic s expresí vysokých hladin lidského solubilního endoglinu, jak můžeme vidět na Obrázcích 17-19. Nález hyalinu v renálních tubulech se vyskytoval u čtyř ze šesti zvířat. Na Obrázcích 16 a 20 je možné vidět kůru ledvin těchto samic, ve které jsme nezaznamenali žádné odchylky v porovnání s kontrolní skupinou. V dalších skupinách jsme nepozorovali žádné histopatologické změny, ani u samců s vysokými hladinami lidského sEng, jak lze vidět na Obrázcích 24-26, ani v kontrolních skupinách samic a samců s nízkými hladinami lidského sEng, jak můžeme vidět na Obrázcích 13-15 a 21-23. Barvení zeleným trichromem jsme zvolili z důvodu možné fibrózy, avšak viditelné zmnožení vazivové tkáně jsme nezaznamenali v žádné skupině. Zelený trichrom zvýraznil zejména vazivo v mesangiu glomerulů a v *tunica adventitia* větších cév.



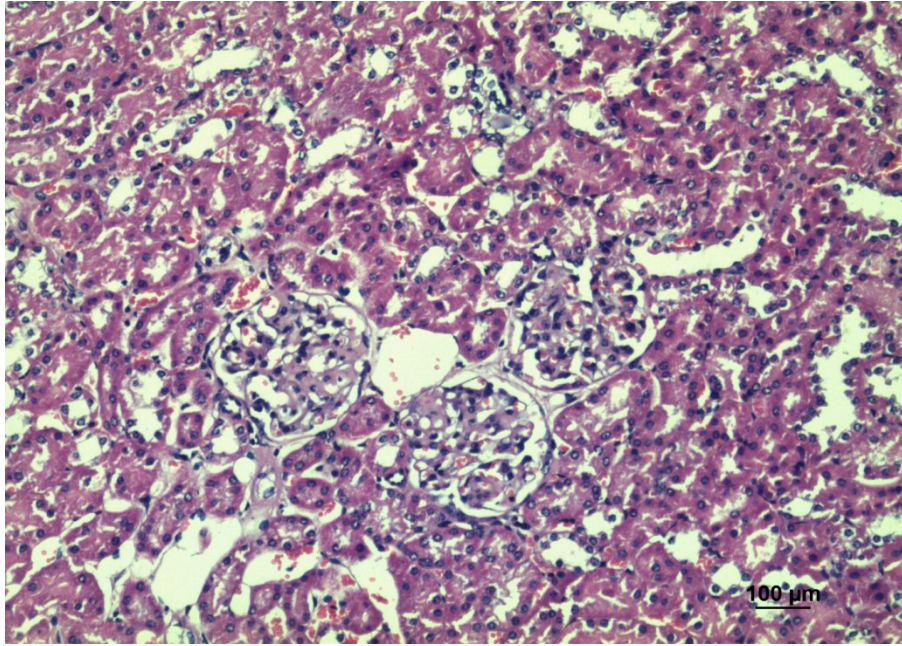
Obrázek 13 -Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem



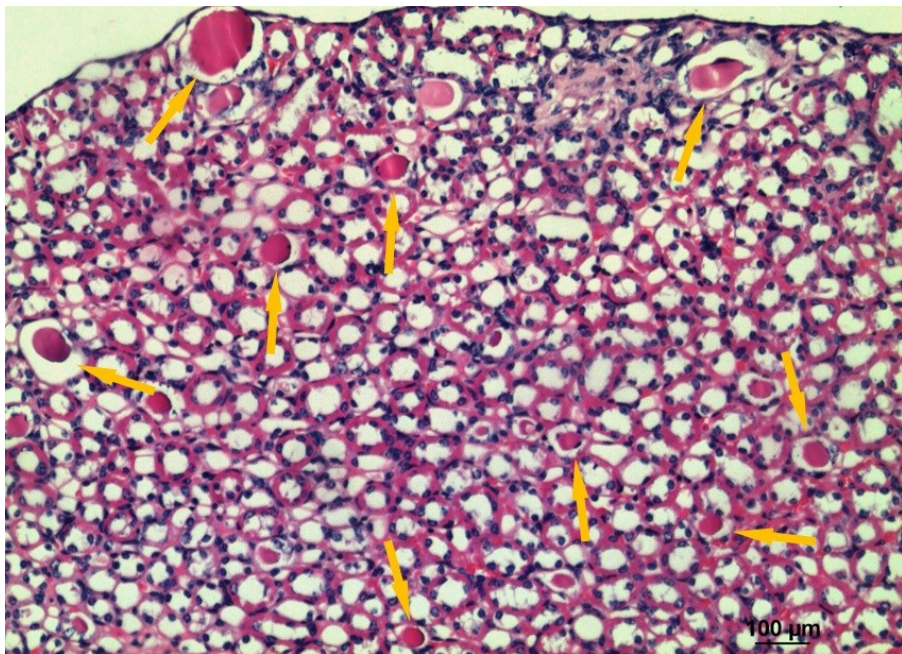
Obrázek 14 - *Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem*



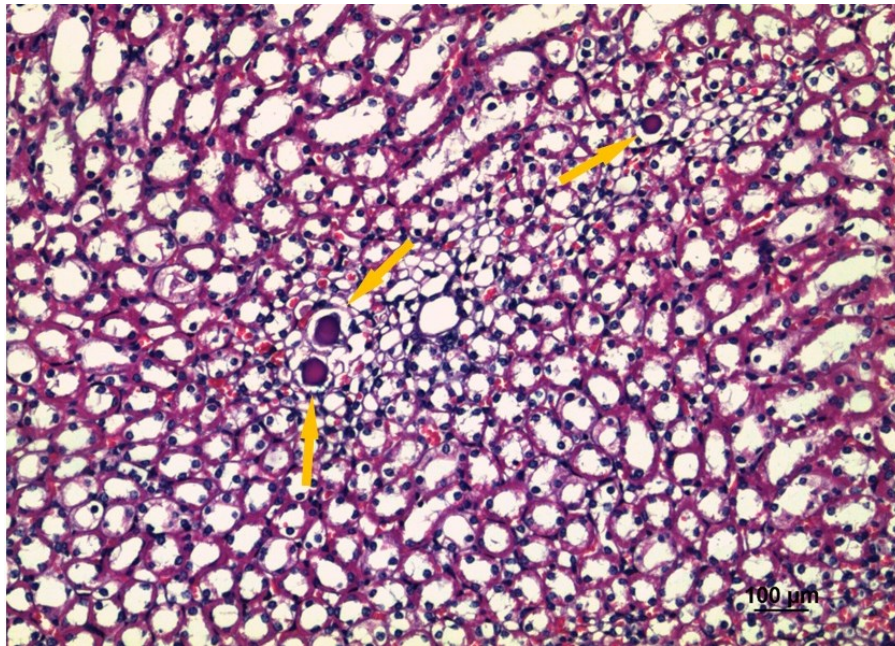
Obrázek 15 - *Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený zeleným trichromem*



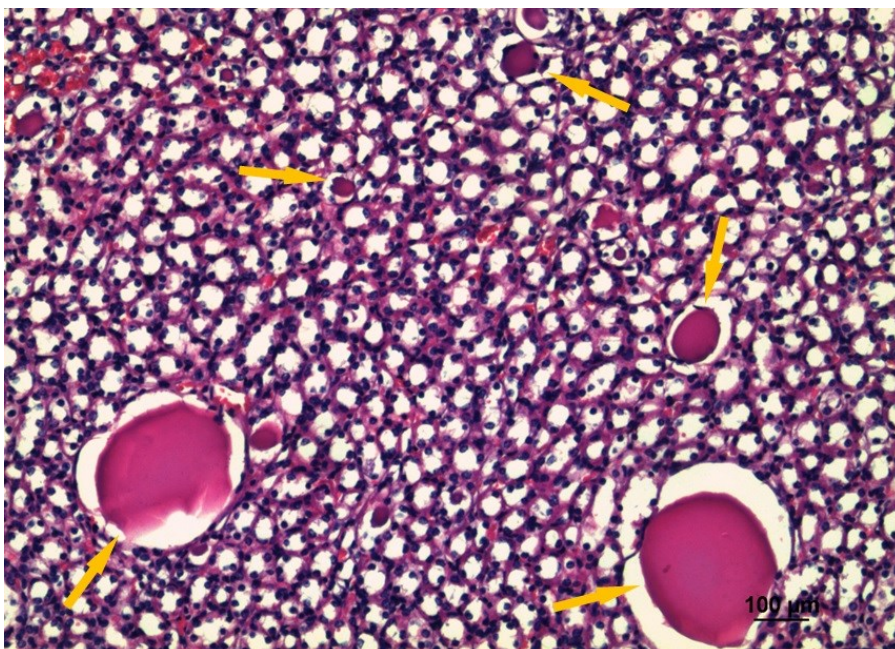
Obrázek 16 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem



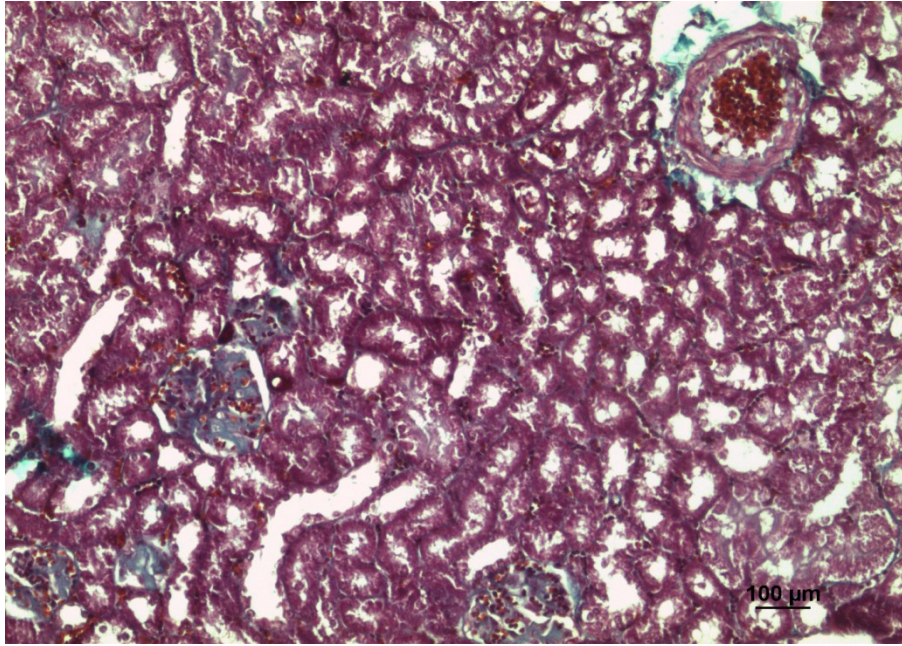
Obrázek 17 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalinu znázorněným šipkami



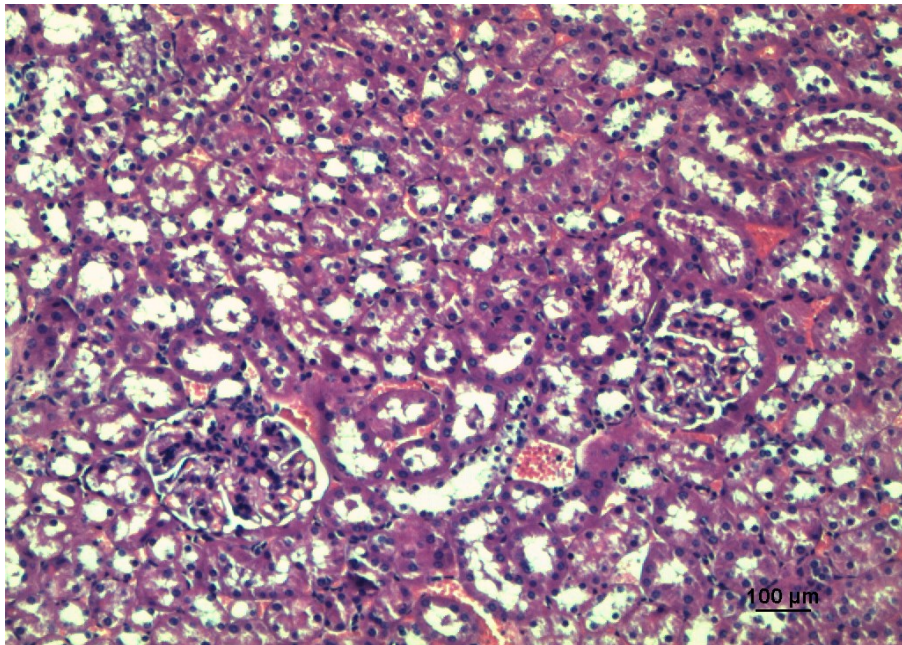
Obrázek 18 - Repräsentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalínu znázorněným šipkami



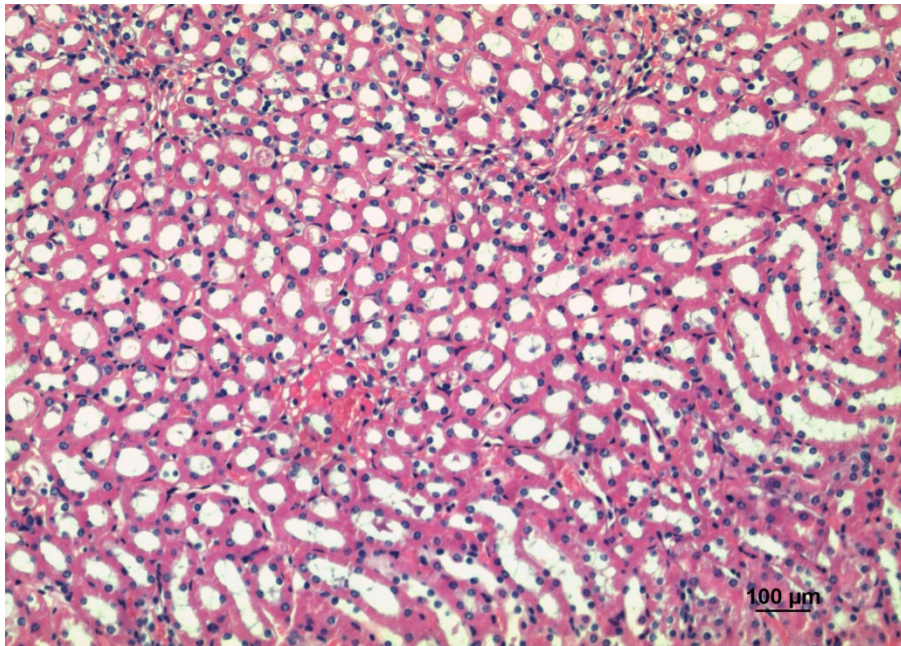
Obrázek 19 - Repräsentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalínu znázorněným šipkami



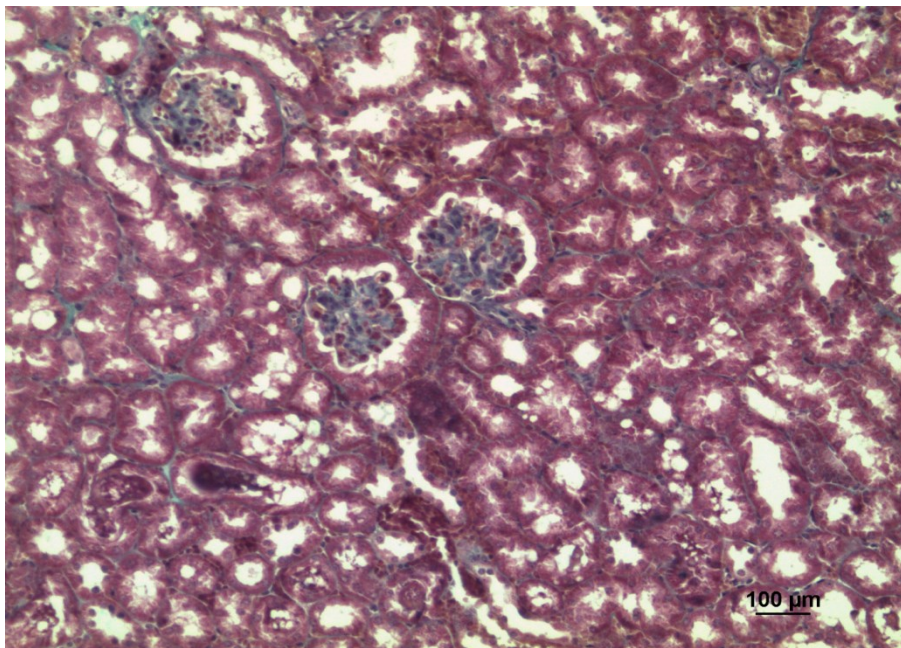
Obrázek 20 - *Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený zeleným trichromem*



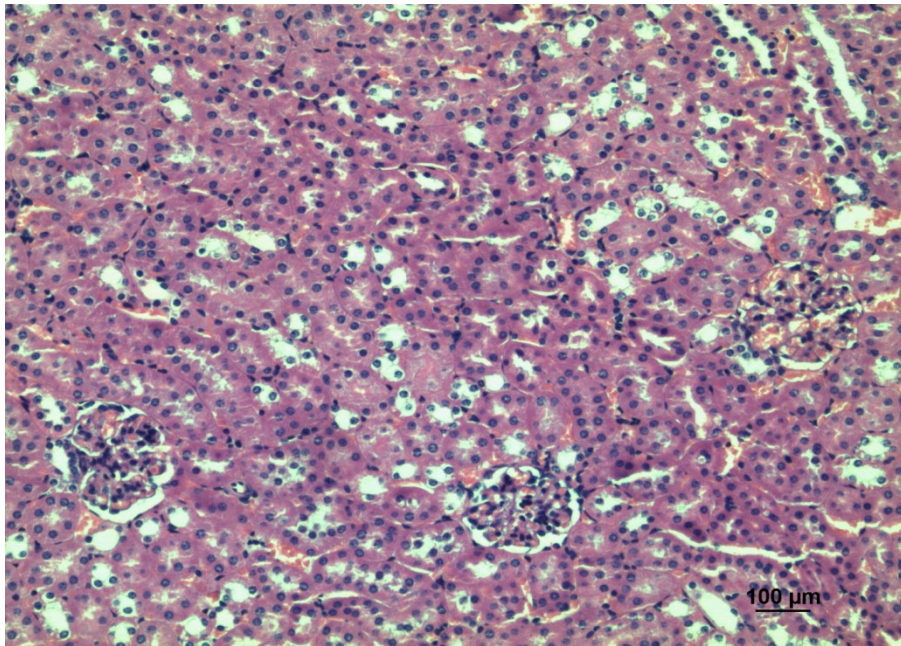
Obrázek 21 - *Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem*



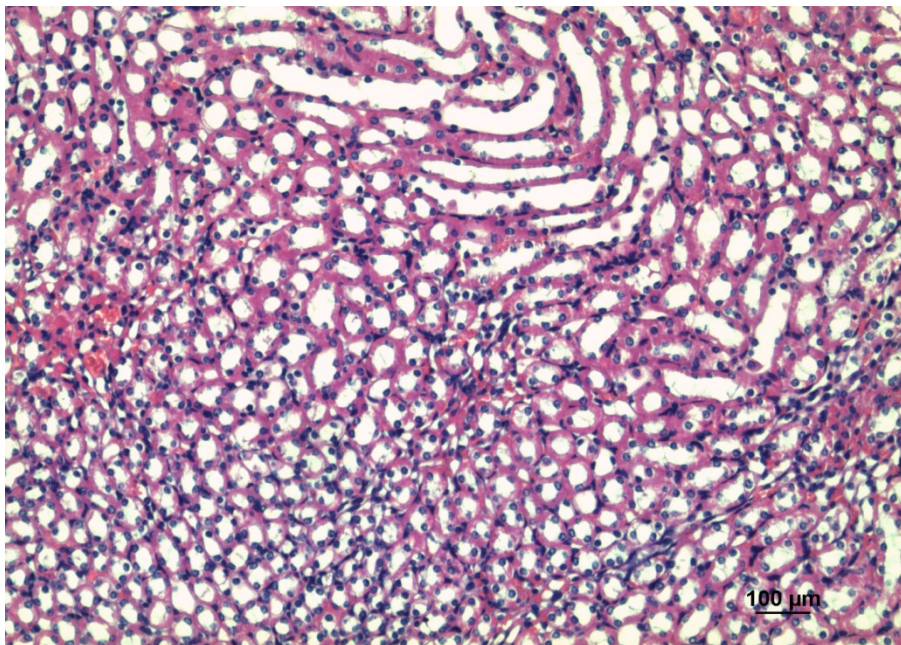
Obrázek 22 - *Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem*



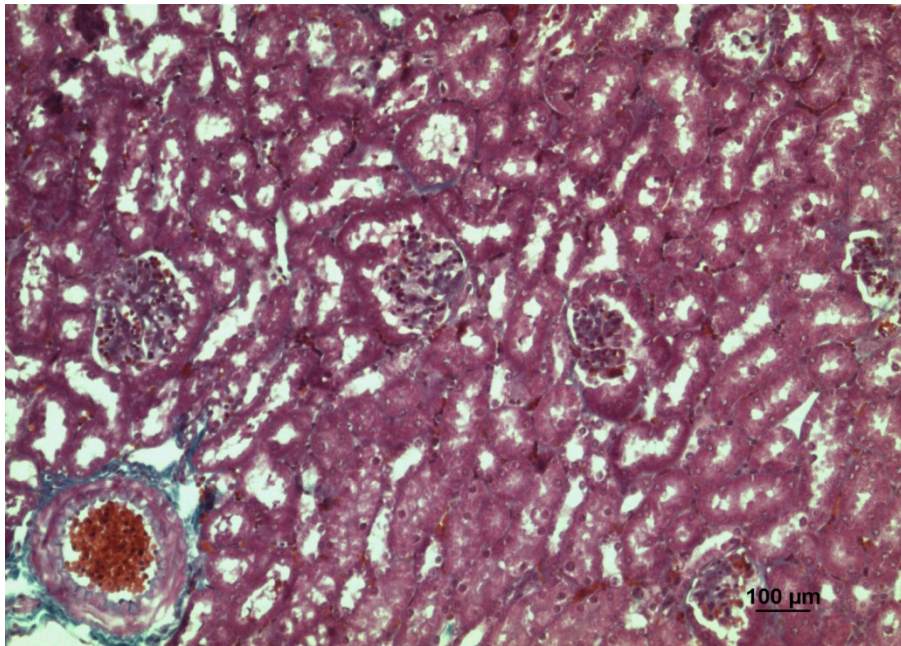
Obrázek 23 - *Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený zeleným trichromem*



Obrázek 24 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem



Obrázek 25 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem



Obrázek 26 - *Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený zeleným trichromem*

6 DISKUZE

Endoglin (CD105, Eng) je transmembránový glykoprotein exprimovaný převážně na povrchu endotelových buněk, který hraje významnou roli v cévním vývoji. (12) (13) Při úplné absenci endoglinu dochází k abnormálnímu vývoji cév i srdce a je známo, že mutace genu pro endoglin vede k rozvoji onemocnění zvaného hereditární hemoragická telangiektázie. (14) (17) Endoglin je přídatný receptor typu III pro molekulu transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), která po navázání na receptor spouští tzv. TGF- β signalizační kaskádu. Tato kaskáda zahrnuje mimo jiné ALK receptory či Smad proteiny, přičemž oba druhy molekul slouží k přenosu informace z buněčné membrány, kam TGF- β nasedá, do jádra buňky. Účinky TGF- β , jakožto multifunkčního cytokinu, jsou různorodé, zajišťuje například proliferaci či diferenciaci různých druhů buněk, hraje také roli v angiogenezi, kdy buď podporuje, nebo inhibuje vývoj krevních cév. (17) (18)

Úkolem endoglinu je právě modulovat TGF- β signalizační kaskádu, jakožto stimulator či naopak inhibitor buněčné odpovědi. Pro proliferaci buněk, a tím pádem i angiogenezi, je přítomnost endoglinu nutná. (18) Při určitých stavech spojených s poškozením endotelu dochází k odštěpení extracelulární části membránově vázaného endoglinu pomocí enzymu matrix metalloproteinázy 14 a do krevního oběhu se uvolňuje solubilní forma endoglinu (sEng). (30) (34)

Solubilní endoglin v krvi vycytává molekuly TGF- β a znemožňuje tak jejich navázání na membránový receptor, díky tomu nedochází k aktivaci signalizační kaskády a tím pádem ani k proliferaci buněk. Účinky sEng jsou tedy antiangiogenní. Stejným mechanismem pak sEng navozuje hypertenzi, kdy pozastavenou TGF- β signalizací nedochází k aktivaci endotelové NO syntázy a produkci NO, což je základem právě pro vznik hypertenze, díky tomu, že nedochází k vazodilataci cév. Solubilní endoglin je ve velké míře spojen s preeklampsií, při které je uvolňován na základě děložní ischemie či hypoxie. (30) (39) sEng je také asociován s onemocněními kardiovaskulárního systému jako je například ateroskleróza či, již zmíněná, hypertenze, které jsou spojeny s endotelovou dysfunkcí. Příčinou endotelové dysfunkce je, stejně jako u hypertenze, narušená cesta aktivace endotelové NO syntázy, na jejímž základě se snižuje biologická dostupnost NO. (31) (40)

Cílem této diplomové práce bylo popsat případné morfologické změny v tkáni ledvin myši s vysokou hladinou solubilního endoglinu v porovnání s ledvinami myši z kontrolní skupiny. Za tímto účelem bylo využito transgenního modelu myši exprimující vysoké hladiny lidského sEng a kontrolní skupiny myši exprimující nízké hladiny sEng. Ledviny těchto myši byly barveny základními barvicími technikami a to hematoxylinem-eosinem, za účelem zobrazení základních struktur tkáně a zeleným trichromem, za účelem zjištění, zda nedochází v ledvinách k fibrotickým změnám, které byly popsány v souvislosti s vysokou expresí endoglinu. (24) (15)

Při mikroskopickém pozorování obarvených řezů jsme pozorovali změny v ledvinách čtyř ze šesti samic s vysokou expresí lidského solubilního endoglinu. Konkrétně jsme u těchto myši zaznamenali výskyt hyalinu ve sběracích kanálcích ve dřeni ledviny. Podobný úkaz, kdy došlo k uložení hyalinu v dilatovaných tubulech dřene ledvin a zároveň i k výskytu zánětlivých infiltrátů, popsal také Valbuena-Diez et al. ve své práci zabývající se účinkem hypoxie na zvýšení exprese solubilního endoglinu. Tento náález autoři připisují pravděpodobně zvýšenému obsahu proteinů v tubulární tekutině. V tomto případě připomíná zvýšená hladina solubilního endoglinu fenotyp podobající se nálezu u preeklampsie (hypertenze, proteinurie a poškození ledvin). (50)

Naše práce doplňuje studie, které jsou zaměřeny především na spojitost solubilního endoglinu s rozvojem endotelové dysfunkce a kardiovaskulárním postižením. Otázkou zůstává proč k nálezu hyalinu v tubulech došlo v našem případě pouze ve skupině samic s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu. Je na dalším zkoumání, zda je tento jev ovlivněn dalšími faktory. V dalším pokračování studie by bylo zajímavé provést také analýzu renální artérie, která bývá velmi často postižena u kardiovaskulárních onemocnění, která jsou spojena s expresí solubilního endoglinu.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo popsat případné morfologické změny v ledvinách transgenních myší s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu v krvi, v porovnání s ledvinami myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu. V našem experimentu jsme došli k výsledkům poukazujícím na výskyt hyalinu v ledvinných tubulech čtyř ze šesti samic myší s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu. Výskyt hyalinu může být způsoben zvýšeným obsahem proteinů v tubulární tekutině. Výsledky této diplomové práce přispěly k lepšímu popisu studovaného myšího modelu a rozšířily tak spektrum podnětů pro další studium.

8 POUŽITÉ ZKRATKY

ACE	Angiotenzin konvertující enzym
ADH	Antidiuretický hormon
ALKR	Activin-like kinase receptor
ANF	Atriální natriuretický faktor
ANG I	Angiotenzin I
ANG II	Angiotenzin II
BMP	Bone morphogenic proteins
ECFC	Endothelial colony forming cells
ECT	Extracelulární tekutina
Eng	Endoglin
eNOS	Endotelová NO syntáza
FH	Familiární hypercholesterolémie
GF	Glomerulární filtrace
HE	Hematoxylin-eosin
HHT	Hereditární hemorhagická telangiektázie
K _f	Glomerulární koeficient
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LDL	Low density lipoprotein
MMP2	Matrix metalloproteináza 2
MMP13	Matrix metalloproteináza 13
MMP14	Matrix metalloproteináza 14
NO	Oxid dusnatý
OECT	Objem extracelulární tekutiny
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor type 1
P _{CG}	Tlak v glomerulárních kapilárách
PIGF	Placental growth factor
PWV	Pulse wave velocity
REF	Renální erytropoetický faktor

sEng	Solubilní endoglin
SFH1	Soluble fms-like tyrosine kinase 1
SNS	Sympatický nervový systém
TGF- β	Transformující růstový faktor β
TK	Krevní tlak
T β R-I	TGF- β receptor typu I
T β R-II	TGF- β receptor typu II
T β R-III	TGF- β receptor typu III
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZP	Zona pelucida

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Frontální řez ledvinou	11
Obrázek 2 - Ledvinové tělísko	13
Obrázek 3 - Přehledný obraz kůry (vlevo) a dřeně (vpravo) ledviny barvené H-E	15
Obrázek 4 - Schematické znázornění reakce organismu na změny OECT.....	18
Obrázek 5 - Schematické znázornění mechanismu tubulární resorpce HCO_3^-	20
Obrázek 6 - Model regulace angiogeneze endoglinem	24
Obrázek 7 - Schematicky znázorněná struktura endoglinu	26
Obrázek 8 - 3D stuktura endoglinu	26
Obrázek 9 - Vznik solubilního endoglinu proteolytickým štěpením membránově vázaného endoglinu	28
Obrázek 10 – Autotechnikon Leica.....	40
Obrázek 11 - Parafínový bloček uchycený v automatickém mikrotomu.....	41
Obrázek 12 - Montování obarvených preparátů	41
Obrázek 13 -Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem.....	46
Obrázek 14 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem.....	47
Obrázek 15 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši kontrolní skupiny barvený zeleným trichromem.....	47
Obrázek 16 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem	48
Obrázek 17 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalinu znázorněným šipkami	48
Obrázek 18 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalinu znázorněným šipkami	49
Obrázek 19 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem s výskytem hyalinu znázorněným šipkami	49
Obrázek 20 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samice myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený zeleným trichromem	50
Obrázek 21 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem.....	50
Obrázek 22 - Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený hematoxylinem-eosinem.....	51
Obrázek 23 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši kontrolní skupiny barvený zeleným trichromem.....	51
Obrázek 24 - Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem	52

Obrázek 25 - <i>Reprezentativní fotografie preparátu dřeně ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený hematoxylinem-eosinem</i>	52
Obrázek 26 - <i>Reprezentativní fotografie preparátu kůry ledvin samce myši s vysokou hladinou lidského sEng barvený zeleným trichromem</i>	53

10 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - <i>Využití zvířat při experimentech rozdělené dle účelu.....</i>	34
Graf 2 - <i>Grafické znázornění zastoupení jednotlivých zvířecích druhů používaných v laboratoři</i>	34

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - <i>Výhody a nevýhody použití zvířecích modelů</i>	36
--	----

12 CITOVANÁ LITERATURA

1. **JUNQUEIRA Carlos, CARNEIRO José a KELLEY Robert O.** *Základy histologie*. H&H, 1997. ISBN: 80-85787-37-7.
2. **ČIHÁK Radomír.** *Anatomie 2*. Grada Publishing, 2002. ISBN: 80-247-0143-X.
3. **KONRÁDOVÁ Václava, UHLÍK Jiří a VAJNER Luděk.** *Funkční histologie*. H&H, 2000. ISBN: 80-86022-80-3.
4. **NAŇKA Ondřej a ELIŠKOVÁ Miloslava.** *Přehled anatomie*. Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-612-0.
5. **TESAŘ Vladimír a SCHÜCK Otto.** *Klinická nefrologie*. Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-0503-6.
6. **KITTNAR Otomar.** *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-3069-4.
7. **MARTÍNEK Jindřich a VACEK Zdeněk.** *Histologický atlas*. Grada Publishing, 2009. ISBN: 978-80-247-2393-8.
8. **TROJAN Stanislav.** *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
9. **GANONG William F.** *Přehled lékařské fyziologie*. a LANGE medical book, H&H, 1999. ISBN: 80-85787-36-9.
10. **SILBERNAGL Stefan a DESPOPOULOS Agamemnon.** *Atlas fyziologie člověka*. Grada Publishing, 2016. ISBN: 978-80-247-4271-7.
11. **TEPLAN Vladimír.** *Praktická nefrologie*. Grada Publishing, 2006. Sv. 2., zcela přepracované vydání. ISBN: 80-247-1122-2.
12. **LOPÉZ-NOVOA José M. a BERNABEU Carmelo.** The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2010, Volume 299, stránky 959–974, doi:10.1152/ajpheart.01251.2009.
13. **SÁNCHEZ-ELSNER Tilman, BOTELLA Luisa M., VELASCO Beatriz a kolektiv.** Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor- β Pathways. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2002, Volume 277, Issue of November 15, No. 46, stránky 43799–43808., doi: 10.1074/jbc.M207160200.

14. **ARTHUR Helen M., URE Jan, SMITH Andrew J. H. a kolektiv.** Endoglin, an Ancillary TGF β Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. *Developmental Biology*. 2000, Volume 217, stránky 42-53., doi:10.1006/dbio.1999.9534.
15. **GARCÍA-POZO Leonor, MIQUILENA-COLINA María E., LOZANO-RODRÍGUEZ Tamara a kolektiv.** Endoglin: structure, biological functions and role in fibrogenesis. *Revista española de enfermedades digestivas*. Órgano oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva, 2008, Volume 100, No.6, stránky 355-360, doi: 10.4321/S1130-01082008000600008.
16. **ROSSI Elisa, BERNABEU Carmelo a SMADJA David M.** Endoglin as an Adhesion Molecule in Mature and Progenitor Endothelial Cells: A Function Beyond TGF- β . *Frontiers in Medicine*. 2019, Volume 6., Article 10, doi:10.3389/fmed.2019.00010.
17. **LEBRIN Franck, DECKERS Martin, BERTOLLINO Philippe a kolektiv.** TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research*. 2005, Volume 65, Issue 1, stránky 599-608, doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.036.
18. **LEBRIN Franck, GOUMANS Marie-José, JONKER, Leon a kolektiv.** Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. European Molecular Biology Organization. *The EMBO Journal*. 2004, Volume 23, No. 20, stránky 4018-4028, doi: 10.1038/sj.emboj.7600386.
19. **LÓPEZ-HERNÁNDEZ Francisco J. a LÓPEZ-NOVOA Jose M.** Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Research*. 2012, Volume 347, Issue 1, stránky 141-154, doi: 10.1007/s00441-011-1275-6.
20. **BERNABEU Carmelo, CONLEY Barbara A. a VARY Calvin P. H.** Novel Biochemical Pathways of Endoglin in Vascular Cell Physiology. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007, Volume 102, No.6, stránky 1375-1388. doi: 10.1002/jcb.21594.
21. **MASSAGUÉ Joan.** TGF- β Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 1998, Volume 67, stránky 753-791, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
22. **TEN DIJKE Peter, GOUMANS Marie-José a PARDALI Evangelia.** Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 2008, Volume 11, Issue 1, stránky 79-89, doi: 10.1007/s10456-008-9101-9.
23. **NACHTIGAL Petr, ZEMÁNKOVÁ (VEČEŘOVÁ) Lenka, RATHOUSKÁ Jana a kolektiv.** The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012, Volume 224, Issue 1, stránky 4-11, ISSN 0021-9150.

24. **RODRÍGUEZ-PEÑA Ana.** Endoglin Upregulation During Experimental Renal Interstitial Fibrosis in Mice. *Hypertension*. 2002, Volume 40, Issue 5, stránky 713-720, doi: 10.1161/01.HYP.0000037429.73954.27.
25. **LLORCA Oscar, TRUJILLO Arturo, BLANCO, Francisco J. a kolektiv.** Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Journal of Molecular Biology*. 2007, Volume 365, Issue 3, stránky 694-705, doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.015.
26. **GOUGOS Anne a LETARTE Michelle.** Primary Structure of Endoglin, an RGD-containing Glycoprotein of Human Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990, Volume 265, Issue of May 25, No. 15, stránky 8361-8364, PMID:1692830.
27. **VELASCO Soraya, ALVAREZ-MUÑEZ Patricia, PERICACHO Miguel a kolektiv.** L- and S-endoglin differentially modulate TGF β 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *Journal of Cell Science*. 2008, Volume 121, Issue 6, stránky 913-919, doi:10.1242/jcs.023283.
28. **PÉREZ-GÓMEZ Eduardo, ELENO Nélida, LÓPEZ-NOVOA Jose-Miguel a kolektiv.** Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*. 2005, Volume 24, stránky 4450-4461, doi:10.1038/sj.onc.1208644.
29. **GALLARDO-VARA Eunáte, BLANCO Francisco J., ROQUÉ Merce a kolektiv.** Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis*. 2016, Volume 19, Issue 2, stránky 155-171, doi: 10.1007/s10456-016-9495-8.
30. **VENKATESHA Shivalingappa, TOPORSIAN Mourad, LAM Chun a kolektiv.** Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*. 2006, Volume 12., Issue 7, doi: 10.1038/nm1429.
31. **BLÁZQUEZ-MEDELA Ana M., GARCÍA-ORTIZ Luis, GÓMEZ-MARCOS Manuel A. a kolektiv.** Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Medicine*., 2010, Volume 8., Issue 86, doi: 10.1186/1741-7015-8-86.
32. **BLÁHA Milan, CERMANOVÁ Melanie, BLÁHA Vladimír a kolektiv.** Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008, Volume 197, Issue 1, stránky 264-270, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.022.
33. **RATHOUSKÁ Jana, JEŽKOVÁ Kateřina, NĚMEČKOVÁ Ivana a kolektiv.** Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2015, Volume 243, Issue 2, stránky 383-388, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.003.

34. **GALLARDO-VARA Eunate, TUAL-CHALOT Simon, BOTELLA Luisa M. a kolektiv.** Soluble endoglin regulates expression of angiogenesis-related proteins and induction of arteriovenous malformations in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Disease Models & Mechanisms*. 2018, Volume 11, Issue 9, doi: 10.1242/dmm.034397.
35. **GREGORY Allison. L., XU Guoxiong, SOTOV Valentin a kolektiv.** Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*. 2014, Volume 35, Supplement A, stránky 93-99. cit, doi:10.1016/j.placenta.2013.10.020.
36. **HAWINKELS Lukas J.A.C., KUIPER Patricia, WIERCINSKA Eliza a kolektiv.** Matrix Metalloproteinase-14 (MT1-MMP)–Mediated Endoglin Shedding Inhibits Tumor Angiogenesis. *Cancer Research*. Tumor and Stem Cell Biology, 2010, Volume 70, Issue 10, stránky 4141-4150, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4466.
37. **BROWNFOOT Fiona C., HANNAN Natalie, ONDA Kenji a kolektiv.** Soluble endoglin production is upregulated by oxysterols but not quenched by pravastatin in primary placental and endothelial cells. *Placenta*. 2014, Volume 35, Issue 9, stránky 724-731, doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.374.
38. **SESSA William C.** eNOS at a glance. *Journal of Cell Science*. CELL SCIENCE AT A GLANCE, 2004, Volume 117, stránky 2427-2429, doi: 10.1242/jcs.01165.
39. **GILBERT Jeffrey S., GILBERT Sara A.B., ARANY Marietta a kolektiv.** Hypertension Produced by Placental Ischemia in Pregnant Rats Is Associated With Increased Soluble Endoglin Expression. *Hypertension*. 2009, Volume 53, Issue 2, stránky 399-403, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123513.
40. **VITVEROVÁ Barbora, BLAŽÍČKOVÁ Kateřina, NAJMANOVÁ Iveta a kolektiv.** Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis*. 2018, Volume 271, stránky 15-25, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.008.
41. **ROSS Russell.** Atherosclerosis - an Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*. January 1999, Volume 340, No. 2, stránky 115-126, ISSN 1533-4406.
42. **AGRAWAL Amit Arvind.** Considerations For Use Of Experimental Animals In Biomedical And Periodontal Research. *International Journal of Innovative Research and Development*. 2013, Volume 2, Issue 11, stránky 56-62, ISSN: 2278-0211.
43. **BERÁNEK Martin a TICHÝ Miloš.** *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. Praha : Karolinum, 2013. ISBN: 978-80-246-2186-9.
44. **BAUMANS Vera.** Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Therapy*. 2004, Volume 11, Suppl. 1, stránky 64-66, doi: 10.1038/sj.gt.3302371.

45. **LEONG Xin-Fang, NG Chun-Yi a JAARIN Kamsiah.** Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Hindawi - BioMed Research International*. 2015, Volume 2015, ISSN: 2314-6133.
46. **FESTING Michael F.W. a ALTMAN Douglas G.** Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal*. 2002, Volume 43, Issue 4, stránky 244-258, doi: 10.1093/ilar.43.4.244.
47. **DENNIS Jr. Melvin B.** Welfare Issues of Genetically Modified Animals. *ILAR Journal*. 2002 Volume 43, stránky 100-109, doi: 10.1093/ilar.43.2.100.
48. **WEINBERG Mea A. a BRAL Michael.** Laboratory animal models in periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999, Volume 26, Issue 6, stránky 335-340, doi:10.1034/j.1600-051X.1999.260601.x.
49. **NĚMEČKOVÁ Ivana, SERWADCZAK Agnieszka, OUJO Barbara a kolektiv.** High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta. *PLoS ONE*. 2015, Volume 10., Issue 3, doi: 10.1371/journal.pone.0119665.
50. **VALBUENA-DIEZ Ana C., BLANCO Francisco J., OUJO Barbara a kolektiv.** Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 2012, Volume 126, Issue 22, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261.
51. **VACEK Zdeněk.** *Histológia a histologická technika*. Martin, Osveta, 1990. ISBN: 80-217-0084-X.