

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Vliv vysokých hladin solubilního endoglinu na morfologii jater
u myši

Bakalářská práce

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

Hradec Králové, 2015

Petra Burešová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, ochotu a čas v průběhu zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat pí. laborantce Pavlíně Lukešové za pomoc a dohled při přípravě histologických preparátů.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 29. 4. 2015

Abstrakt

Autor: Petra Burešová

Název: Vliv vysokých hladin solubilního endoglinu na morfologii jater u myší.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Endoglin (CD 105) představuje integrální transmembránový protein o celkové velikosti 180 kDa. Je charakteristický svou spoluúčastí v signalizační kaskádě transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) díky své roli koreceptoru tohoto faktoru. Kromě membránového endoglinu byla popsána jeho solubilní forma (*sol-Eng*), která se uvolňuje do krevní cirkulace po odštěpení extracelulární části endoglinu. Recentně bylo popsáno, že endoglin je důležitým faktorem v rozvoji fibrózy v selhávajícím myokardu i v játrech. Cílem naší práce bylo zjistit přítomnost fibrózy v játrech transgenních myší.

Pomocí histologické techniky a barvení na kolagenní vazivo jsme hodnotili rozvoj fibrózy u transgenních myší s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu krmených standardní laboratorní dietou nebo vysokotukovou dietou, v porovnání s kontrolními zvířaty s nízkými hladinami lidského solubilního endoglinu.

Výsledky histologického hodnocení ukazují, že vysoké hladiny solubilního endoglinu nemají žádný vliv na rozvoj fibrotických změn v játrech. Nicméně bude zajímavé další hodnocení exprese jednotlivých markerů patogeneze fibrózy na molekulární úrovni.

Klíčová slova: Endoglin, solubilní endoglin, jaterní fibróza, histologická technika

Abstract

Author: Petra Burešová

Title of thesis: Effect of high soluble endoglin levels on the liver morphology in mice

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study course: Medical laboratory technician

Endoglin (CD105) is an integral transmembrane protein with total weight of 180 kDa. It is characterised by its participation in the signaling cascade of transforming growth factor β (TGF- β) due to its role as a co-receptor of this factor. In addition, a soluble form of endoglin (*sol-Eng*) which is produced by proteolytical sheeding from the extracellular part of membrane bound endoglin into circulation was demonstrated. Recently, it was shown, that endoglin is crucial factor in the development of both, cardiac fibrosis in the failing myocardium and liver fibrosis. The aim of our work was to detect liver fibrosis in transgenic mice.

Using basic histological techniques and collagen staining we evaluated development of liver fibrosis in transgenic mice overexpressing human soluble endoglin on chow and high fat diet in comparison with control mice with low levels of human soluble endoglin.

Our histological results show that high soluble endoglin levels have no effect on the development of fibrotic changes in the liver. However, it will be very interesting to evaluate markers of the liver fibrosis pathogenesis at the molecular level.

Key words: *Endoglin, soluble endoglin, liver fibrosis, histological technique*

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	JÁTRA	10
3.1.1	Stroma.....	10
3.1.2	Jaterní lalůček	10
3.1.3	Oběh krve játry	13
3.1.4	Hepatocyty	14
3.2	FUNKCE.....	16
3.2.1	Syntéza proteinů	16
3.2.2	Sekrece žluči	16
3.2.3	Ukládání metabolitů.....	17
3.2.4	Metabolické funkce.....	17
3.2.5	Detoxikace a inaktivace	17
3.2.6	Regenerace jater.....	17
4	ENDOGLIN.....	18
4.1	EXPRESE A FUNKCE ENDOGLINU	18
4.2	FORMY ENDOGLINU	19
4.2.1	Solubilní endoglin.....	19
4.3	ENDOGLIN A NEMOCI	20
4.3.1	Cystická fibróza spojená s jaterním onemocněním	21
4.3.2	Role endoglinu v jaterní fibróze	21
4.3.3	Expres endoglinu v izolovaných jaterních buňkách a jaterní tkáni	22
4.4	Zvířecí modely pro studium funkce endoglinu	23
5	MATERIÁL A METODY	25
5.1	LABORATORNÍ ZVÍŘATA.....	25
5.2	SCHÉMA EXPERIMENTU	25
	Vysokotuková dieta	25
5.3	HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII	26
	Parafínové řezy	26
	Barvení.....	26

5.4	FOTOGRAFOVÁNÍ ZHOTOVENÝCH PREPARÁTŮ	29
6	VÝSLEDKY	30
6.1	Standardní laboratorní dieta	30
6.2	Vysokotuková dieta.....	32
7	DISKUZE	34
8	ZÁVĚR	36
9	SEZNAM ZKRATEK	37
10	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	38
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

1 ÚVOD

Endoglin (*Eng*, CD105) je transmembránový glykoprotein ze signální kaskády transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), který hraje významnou roli v hematopoéze, angiogenezi a vývoji kardiovaskulárního systému. Exprese endoglinu byla nejprve popsána v endotelových buňkách a v hladké svalovině ve stěně cév. Později se však ukázalo, že endoglin může být exprimován také pro-fibrogenními buňkami jako jsou mesangiální buňky, srdeční a sklerodermální fibroblasty a jaterní hvězdčicovité buňky.

Mutace genu pro endoglin je spojována s rozvojem hereditární hemoragické telangiektázie (HHT), preeklampsie, hypertenze, diabetes mellitus, aterosklerózy a v neposlední řadě podporuje nádorovou angiogenezi. Vzhledem k významné úloze TGF- β v rozvoji fibrózy se dá předpokládat, že změny v expresi jeho koreceptoru endoglinu mohou mít podíl na rozvoji fibrotického procesu.

Bylo popsáno, že *Eng* je tvořený cytoplazmatickou, transmembránovou a extracelulární doménou. Za určitých podmínek může být extracelulární část molekuly proteolyticky odštěpena a uvolněna do cirkulace v podobě solubilní formy. Zvýšené hladiny solubilního endoglinu (*sol-Eng*) byly zaznamenány u pacientů s preeklampsií, familiární hypercholesterolémií a u nádorových onemocnění.

Pro studium funkce endoglinu bylo vygenerováno několik myších modelů, jsou to však zejména tzv. knock-out modely, kde dochází k vystřížení genu pro endoglin. V naší práci jsme naopak využili pro studium recentně vytvořený transgenní model myši, které exprimují vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu a zaměřili jsme se na morfologickou charakteristiku jater a rozvoj možných fibrotických změn.

2 ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE

Několik studií, na které se tato bakalářská práce odkazuje, prozkoumávalo vliv membránového endoglinu na různé orgány, včetně jater. V této bakalářské práci jsme se zaměřili na solubilní formu endoglinu a její možný vliv na rozvoj fibrotických změn v játrech transgenních myší.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 JÁTRA

Játra představují orgán, ve kterém se zpracovávají živiny vstřebané trávicím traktem do podoby potřebné ostatním orgánům těla. Jsou tedy orgánem, tvořícím mezičlánek mezi trávicím traktem a krví. Po kůži jsou největším orgánem těla a také největší žlázou, vážící přibližně 1,5 kg. Nachází se v dutině břišní, pod bránicí.

Prostřednictvím vena portae (portální, vrátnicová žíla) přichází do jater zhruba 70 – 80 % krve, zbylé množství přichází díky arteria hepatica (jaterní tepna). Materiál vstřebaný ve střevě je do jater přiváděn portální žílou. Výjimku tvoří chylomikrony, komplexní lipidy, které jsou přenášeny lymfou. K vyloučení toxických látek, které se v játrech shromažďují, transformují a skladují, dochází žlučí, jež představuje exokrinní sekret jater, významný zejména pro trávení lipidů (Junqueira et al, 1997).

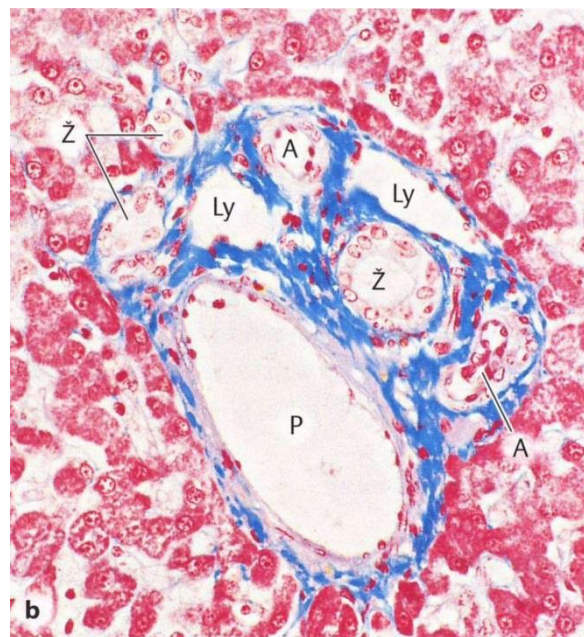
3.1.1 Stroma

Povrch jater pokrývá tenká vrstva vaziva, capsula hepatis Glissoni. V místě vniku porta hepatis dále probíhá toto vazivo podélně s cévami a žlučovody až do míst portobiliárních prostorů, při styku tří jaterních lalůček, v nichž tvoří výplň. Je zde také vyvinuta síť retikulárních vláken, která slouží k podpoře hepatocytů i endotelových buněk jaterních sinusoid (Dooley a Scherlock, 2011; Lüllmann-Rauch, 2012; Junqueira et al, 1997).

3.1.2 Jaterní lalůček

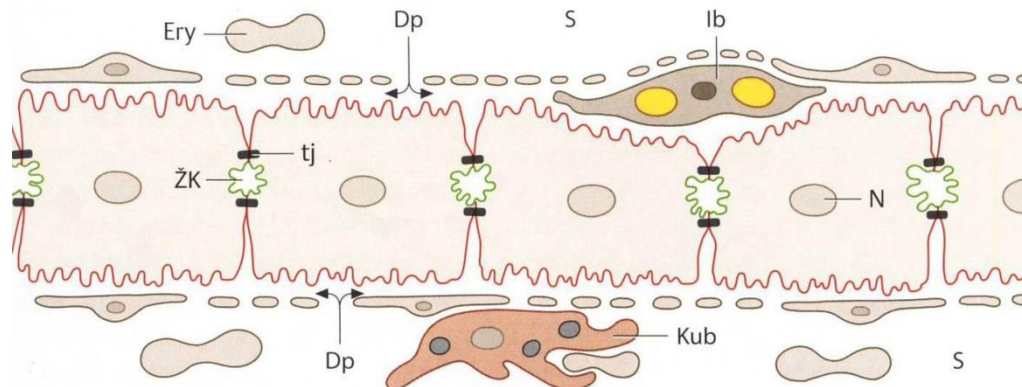
Jaterní, epitelová buňka, tzv. hepatocyt, je hlavní stavební složkou jater. Mikroskopicky tvoří uspořádání hepatocytů jaterní lalůčky, základní morfologické jaterní jednotky. Jaterní lalůčky jsou v těsném kontaktu a tvoří je polygonální masa tkáně o velikosti přibližně 0,7 x 2 mm. Ovšem v některých částech jsou lalůčky odděleny vazivem, zahrnujícím krevní a lymfatické cévy, nervy a žlučovody. Popsané oblasti se nazývají portální (portobiliární) prostory a jsou pro ně charakteristické tzv. portální triády, které se zde nacházejí v počtu 3 – 6 na jeden jaterní lalůček. Každá

portální triáda se skládá z větve vena portae, větve arteria hepatica, části vývodných žlučových cest (žlučovod) a doprovodných lymfatických cév (Obr. 1). Vena portae z břišních orgánů přináší odkysličenou krev a živiny. Arteria hepatica z břišní aorty (truncus coalicus) vede okysličenou krev. Obvykle doprovází portální žíly v portálních triádách a nejmenší větve zásobují sinusoidy na různých úrovních a žlučových úsecích (které většinou později ústí do sinusoid) (MacSween et al, 2012). Žlučovod s charakteristickým kubickým epitelem odvádí z hepatocytů žluč a ústí do ductus hepaticus. Spojením lymfatických cév se lymfa dostává do krevní cirkulace (Junqueira et al, 1997).



Obr. 1: Portální (portobiliární) prostor. Interlobulární vena (P), interlobulární arterie (A), interlobulární žlučovod (Ž), lymfatické cévy (Ly). (převzato z Lüllmann-Rauch, 2012)

Uspořádání hepatocytů v jaterních lalůčkách má radiální tvar. Vrstva o tloušťce až dvou buněk tvoří jaterní trámec. Toto uspořádání směřuje od periferní oblasti do středu lalůčku, kde společně vrstvy anastomozují. Ve vnitřních částech trámců jsou uloženy počátky žlučových kanálků, intercelulární úseky. Prostor mezi trámci je vyplněn kapilárami, jaterními sinusoidami (Kondrádová et al, 2000).



Obr. 2: Trámce jaterních buněk a buňky ve stěnách sinusoid (schéma). Žlučové kanálky (ŽK), tight junction (tj), lumen sinusoidy (S), Disseho prostor (Dp), Itovy buňky (Ib), Kupfferova buňka (Kub), jádro hepatocytu (N), erytrocyt (Ery).
(převzato z Burwen, 2008)

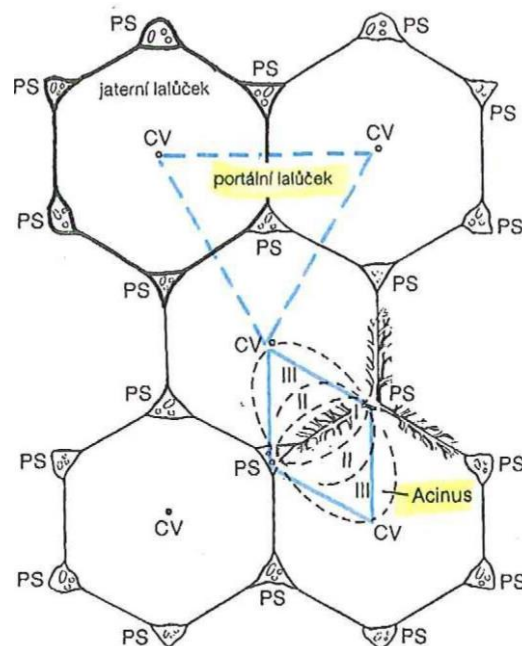
Disseho prostor je subendotelová štěrbina mezi hepatocyty a sinusoidními endotelovými buňkami (Dooley a Sherlock, 2011) a je vyplněna mikrokly hepatocytů a retikulárními vlákny. Sinusoidy také kromě endotelových buněk obsahují buňky mononukleární s fagocytární funkcí (makrofágy), tzv. Kupfferovy buňky. Jejich funkce spočívá v likvidaci starých erytrocytů, trávení hemoglobinu a sekretují proteiny potřebné k imunitním dějům.

Dále se zde nachází buňky skladující tuky, tzv. Itovy buňky. Jsou umístěny v Disseho prostoru a mají hvězdicovitý tvar (Obr. 2). Střádají exogenní vitamin A v tukových kapénkách. Jejich přesná funkce v metabolismu vitaminu A není zatím zcela jasná.

Sinusoidy jsou ohraničeny endotelovými buňkami a vedou od periferie, kde jsou zásobovány venulami, terminálními větvemi portálních žil a jaterními arterioly, do centra, kde vyústí do centrálních vén (Dooley a Sherlock, 2011; Junqueira et al, 1997).

V roce 1954 bylo navrženo dělení jaterního parenchymu v podobě jaterních acinů, které představují funkční jednotky a jsou zásobované terminálními úseky distribučních vén (Rappaport et al, 1954). Jednotka s názvem jaterní acinus je charakteristická svým tvarem vybroušeného diamantu. Střed tohoto útvaru je tvořen konečnými větvemi vena portae, větvemi arterií a žlučovodem. Jaterní acinus je rozdělen do zón, které jsou určeny vzdáleností buněk od distribučních vén. Nejbližší distribuční věně jsou umístěny buňky I. zóny a jsou tak nejvíce vystaveny vlivům látek z přitékající krve. Dále máme buňky II. a III. zóny. Trámce jaterních buněk jsou

součástí strukturních jednotek jaterního parenchymu, jaterních lalůček (Obr. 3) (Junqueira et al, 1997).



Obr. 3: Teritoriální uspořádání jaterních lalůček, jaterních acinů a portálních lalůček. Na obrázku znázorněné šestiúhelníky obsahují ve středu centrální vénu (CV), tvořící osu jaterního lalůčku. V portální triádě a periferii, tvořené třemi přiléhajícími lalůčky a portálním prostorem (PS), má střed portální lalůček tvaru trojúhelníka s vrcholy v centrálních vénách. Prostor vymezený spojením CV-PS-CV-PS náleží jaternímu acinu tvaru kosodélníku (převzato z Junqueira, 1997).

3.1.3 Oběh krve játry

Vena portae a arteria hepatica tvoří dva hlavní systémy, které přivádí krev do jater. Vena portae přivádí téměř 70 % krve. Zbýlý podíl krve, 30 %, zprostředkovává arteria hepatica (Lüllmann-Rauch, 2012). Vena portae i arteria hepatica vstupují do jater prostřednictvím štěrbin, porta hepatis, která leží na spodní ploše pravého laloku. V této štěrbině se vena portae a arteria hepatica větví do pravého a levého laloku, také pravý a levý jaterní žlučovod se zde spojují do jaterního kanálu (Dooley a Sherlock, 2011). Portální krev odtéká z mezenterických, žaludečních, střevních, slezinných a pankreatických žil a je transportována do jater. Zde probíhá neúplně mísení krve přicházející z gastrointestinálního traktu a sleziny, zajišťující dodání různých živin, toxinů a dalších látek do jaterních lalůček (Haywood, 1981; Faa et al, 1987; Faa et al, 1994; Faa et al, 1995; Thein et al, 2003).

Portální oběh

Vena portae se větví do menších portálních venul, ústících do portálních triád. Někdy se nazývají interlobulárními větvemi. Větvení portálních venul dále pokračuje do distribučních vén, soustřeďujících se na periferii lalůček. Distribuční vény se pomocí vstupních venul napojují na sinusoidy. Ty paprskovitě směřují k centrálnímu lalůčku, kde proběhne splynutí do centrální či centrolobulární vény (vena centralis). Centrální véna je po histologické stránce tenkostěnná céva, tvořena pouze endotelovými buňkami, zpevněnými navzájem sítí kolagenních vláken. Postupně na vena centralis navazují sinusoidy a zvětšuje tak svůj průměr, opouští bázi lalůčku a nakonec ústí do větší sublobulární vény, ta splývá s dalšími sublobulárními vénami a vytváří venae hepaticae, ústící do dolní duté žíly (Junqueira et al, 1997).

Arteriální oběh

Větvení arteria hepatica probíhá až ke vzniku interlobulárních arterií. Část interlobulárních arterií slouží k zásobě struktur portobiliárních prostorů a zbylé tvoří vstupní arterioly končící v sinusoidách. Díky tomu sinusoidy obsahují směs arteriální a venózní krve.

K centru klasického jaterního lalůčku teče krev z periferie. To znamená, že kyslík, metabolity, toxické i netoxické látky, jdou nejprve k periferii a až následně do buněk v centru lalůčku (Junqueira et al, 1997).

3.1.4 Hepatocyty

Jaterní buňky (hepatocyty) tvoří téměř 60 % jaterního parenchymu. Mají tvar mnohostěnu a jsou maximálně 30 μm velké. Životnost jaterních buněk u experimentálních zvířat je kolem 150 dní. Hepatocyty mají tři funkční povrchy: první lemuje sinusoidy a Disseho prostor, druhý kanálky a třetí sousední hepatocyty. Neobsahují bazální membrány. Povrch, tvořící rozhraní hepatocytu a Disseho prostoru, je osazen mikroklyky a oddělen od stěn sinusoid (Dooley a Sherlock, 2011). Z důvodu velkého množství mitochondrií a přítomnosti hladkého endoplazmatického retikula je (při barvení hematoxylin/eosin) cytoplazma silně

eosinofilní. V závislosti na vzdálenosti hepatocytu od portálních triád, se mění jeho histochemická, biochemická i strukturální podstata. V místě, kde se navzájem hepatocyty dotýkají, se tvoří tubulární prostor, tzv. žlučový kanálek, od kterého dále postupuje vývodový systém žlučovodů. Kanálky mají průměr asi 1 – 2 μm , obsahují malé množství mikrokvlků a jejich ohraničení je tvořeno plazmalemou sousedních hepatocytů.

Buňky, tvořící okolí žlučových kanálku, jsou sdruženy v těsných spojích, zvaných zonulae occludentes, a pro jejich fyziologickou aktivitu jsou důležité nexy, které se zde také nachází. Žlučový epitel má úlohu zejména výstelky kanálku, oddělující proudící žluč od hepatocytů, ale také ve žlučníku žluč pozměňuje a koncentruje. Žlučové epitely jsou „efektivními informátory“ pro sousedící buňky při produkci mediátorů, kteří se zúčastňují buněčného růstu a reakcí při poranění (Malarkey et al, 2005). Kanálky podél jaterních lalůček postupně anastomozují a tvoří síť, vycházející v periferii v portálních prostorech. Z toho vyplývá, že žluč teče opačným směrem než krev. V periferii se nachází intralobulární žlučovody s kubickým epitelem, Heringovy kanálky, do kterých žluč proudí. Po překročení kraje lalůčku se Heringovy kanálky vlévají do žlučovodů portálních triád. Žlučovody mohou mít kubický až cylindrický epitel a nachází se zde zřetelná vazivová pochva. Jejich zvyšující se silou a splynutím vznikají levý a pravý ductus hepaticus, který následně opouští játra.

Hepatocyty obsahují jedno či dvě poměrně velká, světlá jádra s maximálně dvěma jádérky. Některá jádra mohou vykazovat polyploidii (vícejadernost). Jádra s touto vlastností se vyznačují svou zvýšenou velikostí. Pro hepatocyty je charakteristické velké množství hladkého i drsného endoplazmatického retikula. Drsné endoplazmatické retikulum se shlukuje do tzv. bazofilních tělísek. Hladké endoplazmatické retikulum hepatocytů se vyznačuje zásobou glykogenu, pod elektronovým mikroskopem pozorujeme shluky denzních granul. Pokud klesne hladina glukózy v krvi, je glykogen mobilizován a rozkládá se na potřebnou glukózu. Hepatocyty tak zajišťují rovnováhu jednoho z hlavních energetických zdrojů. Každá jaterní buňka obsahuje velké množství mitochondrií, lipidové kapénky, četné Golgiho komplexy, lyzosomy a peroxisomy (Junqueira et al, 1997).

3.2 FUNKCE

Vzhledem k exokrinní a endokrinní funkci, k množství degradačních, detoxikačních, shromažďovacích a dalších funkcí, jsou hepatocyty považovány za nejvšestrannější buňky těla.

3.2.1 Syntéza proteinů

Hepatocyty produkují proteiny potřebné jak pro svoji potřebu, tak proteiny určené k exportu. Mezi exportované proteiny, syntetizované v hepatocytech, řadíme například albumin, protrombin, fibrinogen a lipoproteiny. Místem syntézy těchto bílkovin jsou polyribosomy, lokalizované na povrchu endoplazmatického retikula.

Pro endokrinní funkci jaterních buněk je charakteristické, že neskladují vzniklé proteiny v cytoplazmě, ale uvolňují je postupně do krevního řečiště. Na syntéze se asi v 5% z celkového množství exportovaných proteinů podílí jaterní makrofágy, Kupfferovy buňky (Junqueira et al, 1997).

3.2.2 Sekrece žluči

Sekrece žluči představuje exokrinní funkci jaterních buněk. Látky, které jsou obsažené v krvi, jsou hepatocyty vylučovány, transformovány a následně vylučovány do žlučových kanálků. Ve žluči je obsaženo mnoho látek – voda, elektrolyty, žlučové kyseliny, fosfolipidy, cholesterol a bilirubin. Po reabsorpci ve střevě a transportu k hepatocytům, je 90% žlučových kyselin opětovně vyloučeno do žlučodů. Tímto se žlučové kyseliny řadí do procesu tzv. enterohepatální cirkulace (Konrádová et al, 2000). Žlučové kyseliny jsou důležité pro rozklad tuků, tzv. emulzifikaci, v trávicím traktu. Ve spolupráci se žlučovými fosfolipidy hrají významnou roli v degradaci cholesterolu a jeho vyloučení z těla.

Po rozpadu hemoglobinu vzniká produkt bilirubin, který je tvořen fagocytárním jaterním systémem sinusoid (Kupfferovými buňkami) a je dále přenášen do hepatocytů. Bilirubin je hydrofobní látka, u které dochází v hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů ke konjugaci s kyselinou glukuronovou. Výsledný bilirubin – glukuronid je již rozpustný ve vodě a je vylučován do žlučových kanálků (Junqueira et al, 1997).

3.2.3 Ukládání metabolitů

V době hladovění jsou hepatocyty důležité kvůli své skladovací funkci. Obsahují glykogen a triacylglyceroly, což jsou látky, které se po jejich mobilizaci rozkládají na tělu potřebné energetické metabolity. Také se zde nachází zásobárna vitamínů, hlavně vitamínu A (Junqueira et al, 1997).

3.2.4 Metabolické funkce

Jaterní buňky jsou centrem glukoneogeneze. Glukoneogeneze představuje proces, kdy se glukóza vytváří z jiných než sacharidových látek (Ledvina et al, 2009). Probíhá zde také deaminace aminokyselin, která vrcholí tvorbou močoviny, jež je prostřednictvím krve transportována do ledvin a následně vyloučena z těla (Junqueira et al, 1997).

3.2.5 Detoxikace a inaktivace

V hladkém endoplazmatickém retikulu vzniká řada enzymů, potřebná k detoxikaci léků a chemických látek. Je zde přítomen například enzym glukuronyltransferáza, který katalyzuje konjugační reakce s kyselinou glukuronovou. Detoxikační procesy zahrnují oxidaci, metylaci či konjugaci s kyselinou glukuronovou (Konrádová et al, 2000).

3.2.6 Regenerace jater

Navzdory pomalé obměně jaterních buněk, vyznačují se játra svou regenerační schopností. Poškozením jaterní tkáně dojde k indukci mitózy hepatocytů. Dělení probíhá do doby, kdy se nenahradí kompletní ztracená či poškozená tkáň. Ztráta zhruba 75% jaterní tkáně u potkanů se kompenzuje přibližně jeden měsíc. Kompenzační mechanismus je u člověka značně omezen a je nejspíš řízen chalonem, cirkulujícími látkami, které mají vlastnost selektivně inhibovat proliferaci jistých typů buněk (Junqueira et al, 1997).

4 ENDOGLIN

Endoglin (*Eng*), též CD105, je homodimerní membránový protein, složený ze dvou podjednotek o hmotnosti 95 kDa, které jsou spojeny disulfidickými vazbami (Gougos a Letarte, 1988). Tento protein se skládá ze tří domén – cytoplazmatické, transmembránové a extracelulární.

4.1 EXPRESE A FUNKCE ENDOGLINU

ENG gen byl mapován na dlouhém raménku lidského chromozomu 9. Kromě endotelových buněk, je také exprimován buňkami hladké svaloviny ve stěně cév, hematopoetickými a mezenchymovými kmenovými buňkami, monocyty/makrofágy, placentárními syncytiotrofoblasty a různými buňkami pro-fibrogenní populace, jako jsou mesangiální buňky, sklerodermální a srdeční fibroblasty a jaterní hvězdčité buňky (hepatic stellate cells – HSC), zastupující důležité funkce v buněčné a orgánové homeostáze a rozvoji různých onemocnění (St-Jacques et al, 1994; Meurer et al, 2011).

Immunofluorescenční značení odhalilo expresi endoglinu převážně v plazmatické membráně. Projevilo se to intenzivním zbarvením v ohniskových bodech a ve vzácných případech i v perinukleární oblasti (Toporsian, 2005).

Dále je endoglin také exprimován v nízkých koncentracích v klidových endotelových buňkách, vysoce exprimován v cévních endotelových buňkách na místech aktivní angiogeneze, během embryogeneze (Jonker et al, 2002; Perlingeiro, 2007), v tkáních při zánětlivém procesu a hojení, na psoriativní kůži (Rulo, 1995), u cévního poškození a v cévách, které zásobují tumory (Bernabeu et al, 2009; Fonsatti et al, 2000; Miller et al, 1999).

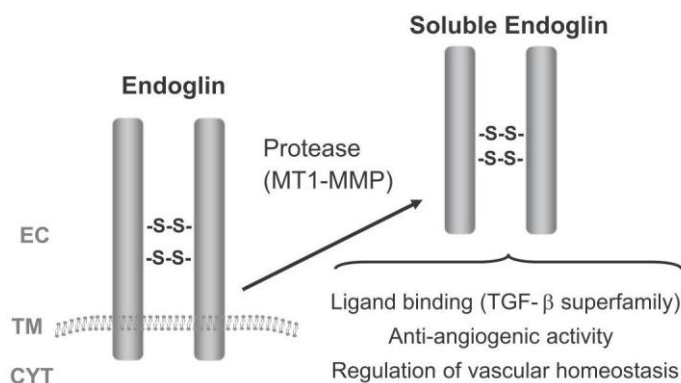
Velice výrazná funkce tohoto proteinu v angiogenezi byla dokázána, když se zjistilo, že myši, které neexprimovaly endoglin, umíraly mezi 10,5 – 11,5 dnem embryonálního vývoje (Li et al, 1999). Je to zapříčiněné tím, že cévy nejsou řádně vyvinuty, což je způsobeno nedostatečným rozvojem hladké svaloviny cév a utlumenou remodelací endotelu.

4.2 FORMY ENDOGLINU

Byly zjištěny různé formy endoglinu. L – endoglin (L – *Eng*, L – CD105, long) a S – endoglin (S – *Eng*, S – CD105, short), označovány dle své délky, a solubilní forma endoglinu. L – a S – izoformy se liší v délkách svých cytoplazmatických domén. Zatímco L – endoglin má tuto doménu o délce 47 aminokyselin, S – endoglinová doména se sestává ze 14 aminokyselin (Cheifetz et al, 1922). Jeho solubilní forma bude popsána níže.

4.2.1 Solubilní endoglin

Sol-Eng byl detekován metodou ELISA a Western blot analýzou v plazmě, séru a moči pacientů s preeklampií a nádory. Čistý cirkulující *sol-Eng* byl získán od preeklampických pacientů a jeho částečná peptidová sekvence naznačila, že jde o štěpný produkt NH₂ – konce L – endoglinu (Obr. 4). Předpokládá se, že na proteolytickém štěpení se podílí MMP14 (matrix metalloproteinase 14) (Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010). Různé studie potvrzují, že *sol-Eng* má významnou roli při vzniku preeklampsie. U preeklampických žen, zvýšená hladina solubilního endoglinu předchází nástupu nemoci a je spojena se závažností onemocnění. Proto jeho detekce je považována za prognostický faktor (Levine et al, 2006). Dále bylo zjištěno, že přispívá i ke vzniku onemocnění, které se vyznačují vysokým krevním tlakem a u poškození placentární cirkulace (Venkatesha et al, 2006). Značně zvýšené hladiny se také objevily u pacientů s kombinací hepatocelulárního karcinomu a cirhózy (Yagmur et al, 2007).



Obr. 4: Vznik solubilního endoglinu proteolytickým procesem z membránově vázaného endoglinu (převzato z Lopez-Novoa a Bernabeu, 2010).

Nicméně, role solubilního endoglinu v signalizaci TGF- β 1 je sporná. Původně se ukázalo, že solubilní doména je schopná snížit aktivitu genu pro TGF- β 1 a aktivitu endotelové syntázy oxidu dusnatého (eNOS) v buňkách endotelu. Ve spojitosti s funkcí odloučeného ligandu, komplexy solubilního endoglinu a TGF- β 1 byly detekovány metodou ELISA a imunoprecipitací v séru pacientů s nádory prsou (Li et al, 1998). Přestože část ligandu TGF- β 1 váže komplex, přímá vazba TGF- β 1 k endoglinu je sporná (Cheifetz et al, 1992; Barbara et al, 1999). Jestliže jsou přítomny signalizační receptory typu I a II, endoglin může být vysrážený se značeným ligandem. Na jednu stranu, když je endoglin nadměrně exprimován v buňkách s chybějícími receptory typu I a II, neuskutečňuje se zde žádná vazba endoglinu k TGF- β 1 (Barbara et al, 1999). Vzestup koncentrace solubilního endoglinu u preeklamptických žen a některé studie zaměřené na funkci solubilního endoglinu používaly systémy s nadměrnou expresí a luciferázové testy, které dávaly podnět k tomu, že solubilní endoglin se skutečně podílí na signalizaci TGF- β 1 (Venkatesha et al, 2006; Hawinkels et al, 2010).

Navzdory informacím, které nám poskytují různé studie zabývající se expresí solubilního endoglinu, přímé navázání ligandu a funkční mechanismy používané u *sol-Eng* k ovlivnění buněčné odpovědi, musí být v budoucnu analyzovány více do detailů. Nejsou aktuální žádná data založená na funkčních aspektech *sol-Eng*, speciálně v játrech (Meurer et al, 2014).

4.3 ENDOGLIN A NEMOCI

Mutace pro gen endoglinu jsou spojovány s dědičnými autosomálněmi chorobami a mohou způsobovat arteriovenózní malformace v orgánech, jako jsou mozek, plíce a játra.

Jedna ze spojitostí se týká vlivu endoglinu na vznik dědičné hemoragické telangiektázie typu 1 (HHT – 1). Různé mutace se projevují odlišnými fenotypogenotypovými vztahy, které se odrážejí v závažnosti HHT-1 (Bayrak-Toydemir et al, 2006).

Dále bylo ukázáno, že solubilní endoglin, jako anti-angiogenetický faktor, se podílí na vzniku preeklampsie (Levine et al, 2006).

Jiný záznam poukazuje na *sol-Eng* u diabetických pacientů (Motawi et al, 2014), jako na ukazatele odhadovaného vývoje nebo účinnosti léčby, například při

aterosklerotickém procesu (Blaha et al, 2008; Nachtigal et al, 2012), systémovém lupus erythematosus (Bassyouni et al, 2012), rakovině plic, prsu a tlustého střeva (Davidson et al, 2010; Bellone et al, 2010), hypertenzi (Blazquez-Medela et al, 2010), neprůchodnosti žlučníku (Preativatanyou et al, 2010) a cystické fibróze spojené s nemocí jater (Rath et al, 2013) a spoustu dalších nemocí.

4.3.1 Cystická fibróza spojená s jaterním onemocněním

Cystická fibróza (CF, mukoviscidóza) je autosomálně recesivní genetické onemocnění postihující plíce, slinivku břišní, játra a střevo. Mutace v genu pro protein CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) způsobuje abnormální transport chloridových a sodných iontů přes epitel, což má za následek viskózní sekreci (Lubamba et al, 2012). Nejzávažnější symptomy napadající plíce, často vyžadují plicní transplantaci nebo způsobují smrt. Gastrointestinální symptomy jsou běžné (Gelfond a Borowitz, 2013). Často je také diagnostikována cystická fibróza spojená s jaterním onemocněním (CFLD) (Leeuwen et al, 2014).

Výzkumy prokázaly zvýšení exprese endoglinu u cystické fibrózy spojené s jaterním onemocněním. Hladiny solubilního endoglinu v séru byly nejvyšší u pacientů s hepatitidou typu C (HCV) s kompletní jaterní cirhózou (Rath et al, 2013). Podněcuje to názor, že tento protein má blízký vztah k jaternímu poškození. Z tohoto důvodu je endoglin dalším nadějným sérovým markerem s potenciálem zlepšit přesnost neinvazivního stanovení CFLD.

Nedávná studie prokázala, že pacienti trpící CFLD vykazují zvýšení TIMP – 4 (tkáňový inhibitor metaloproteázy 4) a endoglinu v séru (Rath et al, 2013). Úroveň exprese endoglinu ukazuje značnou souvislost se závažností jaterního poškození, z toho důvodu umožňuje, spolu s přechodnou elastografií, zvýšení citlivosti u neinvazivních diagnóz CFLD u pacientů s CF. Tyto poznatky naznačují, že endoglin hraje aktivní roli v patologii jaterní fibrózy.

4.3.2 Role endoglinu v jaterní fibróze

Jaterní fibróza je výsledkem mnoha typů chronického jaterního poškození. Nadměrná akumulace proteinů extracelulární matrix (ECM) podporuje jaterní zjizvení

a dokonce vede k orgánovému selhání (Bataller a Brenner, 2005). V patogenezi jaterní fibrózy představuje TGF- β důležitý fibrogenní cytokin. Podporuje rozvoj fibrózy několika různými mechanismy, zahrnujícími přímou aktivaci HSC, stimulaci produkce ECM, indukuje syntézu tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs), čímž inhibuje degradaci ECM (Brenner, 2009). U knock-out modelů myši s delecí jednotlivých částí TGF- β kaskády (TGF- β 1, SMAD3, MMP13) se fibróza rozvíjí mnohem méně (Kanzler et al, 1999). TGF- β ligandy a receptory vytváří komplexní signální síť, která může být modulována endoglinem a betaglykanem.

Prozatím není známo, jak je regulována exprese různých isoform endoglinu a *sol-Eng* v jaterních buňkách. Je však známo, že koncentrace *sol-Eng* se během jaterní fibrogenese zvyšuje. V předešlých studiích jsme mohli vidět, že exprese endoglinu je zvýšená v aktivovaných HSC *in vitro* a v myších modelech s jaterním poškozením *in vivo* (Meurer et al, 2005). HSC jsou hlavními zdroji produkce ECM u jaterní fibrózy.

Všechny tyto poznatky ukazují, že endoglin je jeden z centrálních spínačů, kontrolujících fibrotickou a antifibrotickou aktivitu tím, že produkuje více forem regulací ligandové afinity, určuje úroveň exprese a interaguje s mnohostrannou sítí receptorů, díky čemuž moduluje specifické výsledky TGF- β dependentních i ne-dependentních drah (Meurer et al, 2014).

4.3.3 Exprese endoglinu v izolovaných jaterních buňkách a jaterní tkáni

Endoglin je vysoce exprimován v proliferujících cévních endotelových buňkách. Nicméně, bylo prokázáno, že endoglin je exprimován HSC a také aktivovanými myofibroblasty (MFB) (Meurer et al, 2005). Molekulárním klonováním cDNA endoglinu, povrchovým značením, imunoprecipitací a imunocytochemickými experimenty bylo ukázáno, že endoglin hraje významnou roli v jaterním poškození a rozvoji fibrózy. Exprese endoglinu je různě regulována v plazmatické membráně HSC, ale také v aktivovaných MFB, roste při transdiferenciaci HSC a u dvou experimentálních modelů jaterní fibrózy, ne však přímo v hepatocytech. Mimoto, endoglin je exprimován kultivovanými portálními fibroblasty, které reprezentují další fibrogenní typ žlučových onemocnění jater (Meurer et al, 2011; Meurer et al, 2005). Přechodná nadměrná exprese endoglinu vede ke značnému nárůstu fosforylace Smad1/5 řízené TGF- β 1 a exprese α -aktinu hladké svaloviny, zatímco fosforylace Smad2 není

měněna (Meurer et al, 2011). Tyto výsledky jsou ve spojitosti se studiem, které ukázalo, že endoglin podporuje signalizaci TGF- β 1/ALK1-Smad1/5 v endotelových buňkách (Lebrin et al, 2004).

Kvůli komplexnosti endoglinu a signalizační cesty TGF- β je důležité studium modulace signální transdukce TGF- β v buňkách různého původu. Byly zjištěny rozdílné efekty izoform endoglinu v L6E9 myoblastech (Velasco et al, 2008). Protože tyto buňky neexprimují endogenní endoglin, tato buněčná linie je ideální nástroj k selektivní expresi specifických izoform endoglinu a k ukázání rozdílných a občas protikladných efektů L- a S- endoglinových izoform na regulaci TGF- β indukovaných odpovědí. Zatímco exprese endoglinu je dobře prozkoumána u cévních endotelových buněk, HHT a tumorové angiogeneze, role endoglinu u jaterního poškození je velmi málo popsána. Nicméně, je potřeba dalších podrobných studií na buněčných liniích exprimujících endoglin nebo další složky TGF- β kaskády, stejně tak na buňkách s nízkou endogenní expresí endoglinu pro objasnění funkce endoglinu u jaterního poškození a fibrózy (Meurer et al, 2014).

4.4 Zvířecí modely pro studium funkce endoglinu

Deficit endoglinu u lidí se projevuje silně pozměněným fenotypem a je zodpovědný za rozvoj mnoha chorob, jako například HHT – 1, preeklampsie, jaterní fibrózy a nádorů. Ke studiu jeho účinku na patogenezi těchto onemocnění, byly použity knock-out myší modely s delecí genu pro endoglin. Protože homozygotní knock – out genu pro endoglin je letální již v embryonálním stádiu, bylo zavedeno několik alternativních strategií. Endoglin hraje důležitou roli v angiogenezi. Kompletní deficit endoglinu má fatální důsledky v rozvoji srdce a větších cév. Ke studiu role endoglinu *in vivo* a jeho dopad na HHT – 1 byly vygenerovány myši nesoucí cílené nonsense mutace (delece exonů 9 – 11) v genu pro endoglin (Arthur et al, 2000). Charakteristika těchto myši ukázala, že exprese endoglinu je esenciální pro časný vývoj cév. Embrya se dvěma mutovanými geny pro endoglin umírají mezi 10 – 10, 5 dnem kvůli malformacím kardiovaskulárního systému a selhání vyhrávání krevních cév ve žloutkovém vaku. Embrya nesoucí knock-outový gen pro homozygotní endoglin vytvořený delecí 609 bp (zahrnující exon 1) ukazují podobný fenotyp jako myši, kterým chybí TGF- β 1 a TGF- β receptor II. Podněcuje to fakt, že endoglin hraje zásadní roli v signalizaci TGF- β

v časném cévním rozvoji (Bordeau et al, 1999; Li et al, 1999). Bylo zaznamenáno, že myši, kterým chybí funkčně aktivovaný endoglin záměnou prvních dvou exonů umírají na chybný vývoj cév, ale neukazují neúplnou vaskulogenezi, která je pozorována u myši s chybějícím TGF- β 1 (Li et al, 1999). Ztráta endoglinu zapříčiňuje slabý rozvoj buněk hladké svaloviny ve stěně cév a zpomalenou endotelovou přestavbu. Proto je endoglin potřebný pro růst a tzv. sprouting (větvení) kapilár a diferenciaci mezenchymálních buněk v hladkosvalové buňky a pericyty (Allison et al, 2007). Obě studie ukazují jen malé rozdíly v embryonálním vývoji cév.

Dále byly vyvinuty heterozygotní myši s knock-out genem ke zkoumání funkce endoglinu a zároveň aby nedošlo ke smrti již v embryu. Tyto heterozygotní myši vykazovaly stejný multiorgánový cévní fenotyp podobně jako je tomu u lidí s HHT-1, která je často způsobená haploinsuficiencí endoglinu (Bordeau et al, 2001).

Další modely využívají vystřížení genu pro další molekuly v TGF- β kaskádě, např. ALK-1, kdy tyto myši vykazují postižení pulmonálního cévního řečiště, které můžeme pozorovat u HHT-2 (Park et al, 2008).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 LABORATORNÍ ZVÍŘATA

V experimentu byli použiti samci transgenních myší exprimujících vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu (*sol-Eng*⁺) a jako kontrolní skupina byli použiti samci transgenních myší s nízkou expresí lidského solubilního endoglinu (na pozadí kmene CBAxC57BL/6J, Univerzita Salamanca, Španělsko) ve věku 4-6 měsíců (chow skupiny) a 7-9 měsíců (HFD skupiny). Zvířata byla chována ve viváriu FaF v Hradci Králové za standardních laboratorních podmínek (klimatizovaný vzduch, teplota 15-21°C, vlhkost 50-60% a 12 hodinový cyklus světla a tmy) a měla volný přístup k vodě a potravě.

Všechny experimenty byly provedeny ve shodě s EEC (86/609/EEC) a použití zvířat bylo schváleno Etnickou komisí pro ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze (číslo povolení: 21558/2013-2).

5.2 SCHÉMA EXPERIMENTU

Myši byly rozděleny na skupiny podle přijímané diety (standardní laboratorní dieta, chow vs. vysokotuková, High Fat Diet, HFD) a hladin lidského solubilního endoglinu v plasmě (kontrola vs. *sol-Eng*⁺).

Vysokotuková dieta

Potrava ve formě této diety se skládala z dávek proteinů (kasein), karbohydrátů (kukuřičný škrob, maltodextrin, sacharóza, celulóza), tuků (sójový olej, kakaové máslo), směsi minerálů a vitamínů a cholesterolu. Jelikož je tato dieta vysokotuková, bylo zde zvýšené 40% množství tuků a 1,25 % cholesterolu cholesterolu (Research Diet Inc., USA) Dieta byla podávána *ad libitum* zvířatům od věku 4-6 měsíců po dobu 3 měsíců.

5.3 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII

Parafínové řezy

Zvířata byla usmrcena v hluboké ketamin-xylazinové narkóze. Játra byla chirurgicky odstraněna a byla imerzně dofixována ve 4% paraformaldehydu při pokojové teplotě. Tkáň byla následně odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou, dále projasněna xylenem a zalita do parafínu. Z parafínových bločků byly nakrájeny řezy o tloušťce 7 μm . Řezy byly lepeny na podložní sklo pomocí kamencové želatiny. Po odparafínování a zavodnění byly řezy standardně obarveny hematoxylinem a eosinem a zeleným trichromem. Obarvené řezy prošly opět dehydratací ve vzestupné alkoholové řadě, byly projasněny xylenem a montovány do montovacího média (Eukitt, Sigma-Aldrich, USA).

Barvení

Hematoxylin a eosin (H&E)

Hematoxylin spolu s eosinem slouží k orientačnímu znázornění histologické stavby tkáně.

Příprava roztoků:

Gillův hematoxylin (na 2 l roztoku):

- Hematoxylin 8 g
- Jodičnan sodný 0,8 g
- Síran hlinitý 70,4 g
- Destilovaná voda 1420 ml
- Ethylen-glykol 500 ml
- Kyselina octová (ledová) 80 ml

- rozpustit hematoxylin, jodičnan sodný a síran hlinitý v destilované vodě (rozpustit každé zvlášť a pak teprve smíchat)
- přidat ethylen-glykol a promíchat
- naposledy přidat kyselinu octovou

Eosin:

- Žlutavý eosin rozpustný ve vodě 10 g
- Dichroman draselný 5 g
- Destilovaná voda 800 ml

- Rozpustit

- Přidat:

- Nasycený roztok kyseliny pikrové 100 ml
 - Absolutní čistý ethanol 100 ml
- (přidávat po kapkách za stálého míchání)

Diferenciační roztok:

- 70% ethanol 100ml
- Kyselý alkohol 100ml

Postup barvení:

Odparafinujeme preparát třikrát v xylenu po pěti minutách, dalších pět minut v 95% ethanolu a pět minut v 70% ethanolu. Následně barvíme v Gillově hematoxylinu čtyři minuty. Opláchneme v diferenciační lázni, propereme pod tekoucí vodou (dojde ke zmodrání jader) a barvíme v roztoku eosinu čtyři vteřiny. Dále opláchneme ve vodě, odvodníme, projasníme a montujeme na podložní sklíčko.

Výsledek barvení:

Jádra buněk jsou modrá, kolagenní vazivo růžové a svalovina se zbarví do červena.

Zelený trichrom – Goldner

Tento typ barvení se používá na vizualizaci kolagenního vaziva.

Příprava roztoku dle Goldnera:

Goldner I:

a) Ponceau R	1 g	
Koncentrovaná kys. octová	1 ml	20 ml
Dest. voda	100 ml	
	+	
b) Oranž G	1g	
Koncentrovaná kys. octová	1 ml	10 ml
Dest. voda	100 ml	
	+	
c) Fuchsin S	1 ml	
Koncentrovaná kys. octová	1 ml	10 ml
Dest. Voda	100 ml	
	+	
d) Destilovaná voda		40 ml

(Poznámka: Fuchsin S = rubín S)

Goldner II:

1% vodní roztok kys. fosfowolframové

Goldner III:

Světlá zeleň	1, 5 g	
Kys. octová ledová	2 ml	
Destilovaná voda	100 ml	

Postup barvení je následující:

Nejdříve zhotovené preparáty opláchneme destilovanou vodou. Dále je na čtyři minuty ponoříme do směsi Hematoxylin Gill + destilovaná voda (v poměru 1 : 3). Vložíme pod tekoucí vodu, která způsobí modrání preparátu. Po 1 minutě barvíme směsí Goldner I, kterou necháme působit 10 minut. Opláchneme destilovanou vodou. Následuje barvení směsí Goldner II, také po dobu 10 minut, opláchneme destilovanou vodou, barvíme směsí Goldner III pět minut a opláchneme destilovanou vodou spolu s kyselinou octovou. Po dalším opláchnutí 96% alkoholem následuje tři minutové odvodnění preparátů v aceton/xylenu, dále v xylen/acetonu, také po dobu tří minut. Ve třech následujících krocích preparáty po dvou minutových intervalech postupně promýváme v xylenu. V posledním kroku montujeme sklíčka.

Výsledek barvení:

V mikroskopii hotových preparátů se kolagenní vazivo obarvilo zeleně, jádra modře, svalovina cihlově červeně, erythrocyty oranžově a hyalinní vazivo červeně.

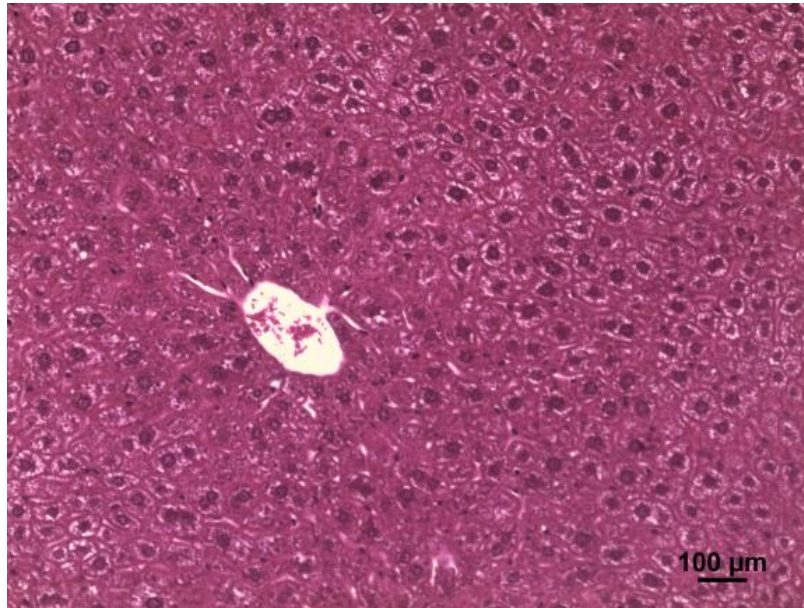
5.4 FOTOGRAFOVÁNÍ ZHOTOVENÝCH PREPARÁTŮ

Fotodokumentace a obrazová digitalizace byla zhotovena použitím 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).

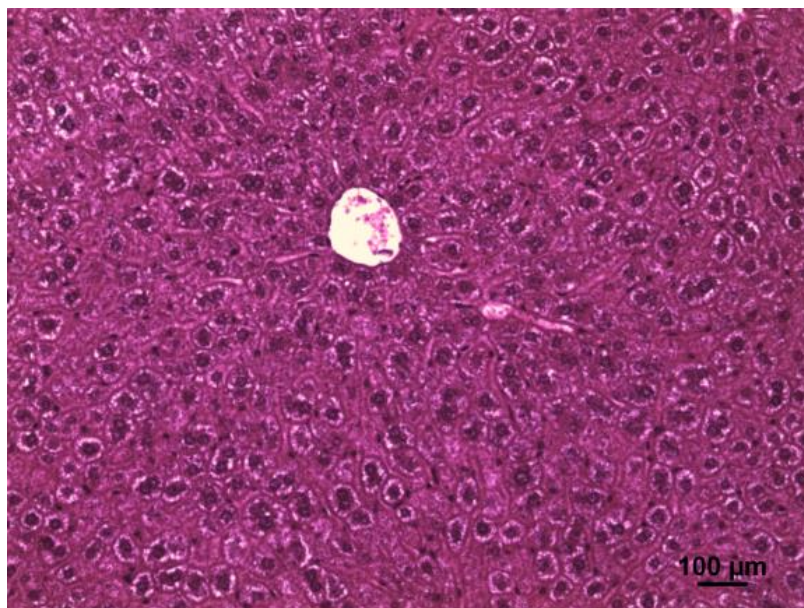
6 VÝSLEDKY

6.1 Standardní laboratorní dieta

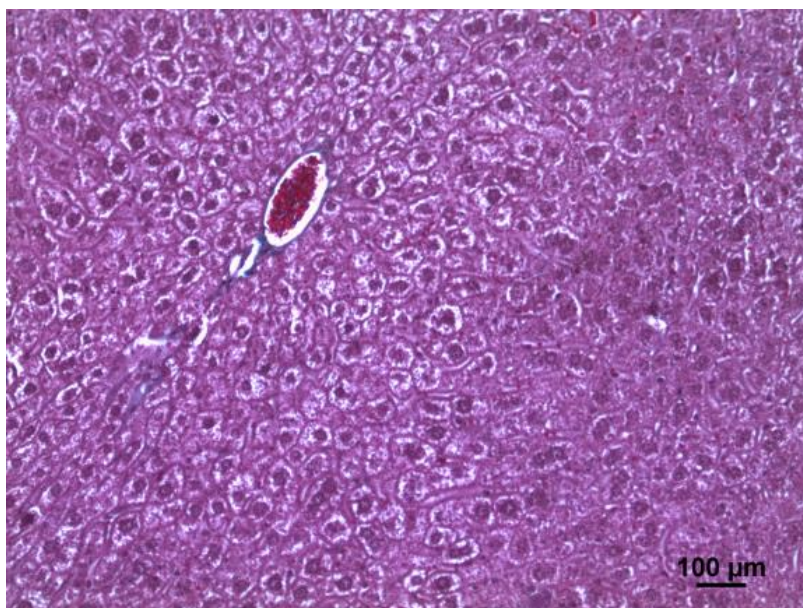
Při porovnání kontrolních zvířat s nízkými hladinami solubilního endoglinu a myši *sol-Eng*⁺ jsme nezaznamenali žádné rozdíly v morfologické stavbě jater, jak je znázorněno na obr. 5, 6. Barvení zeleným trichromem nám neukázalo žádné fibrotické změny u zvířat *sol-Eng*⁺ v porovnání s kontrolními zvířaty (Obr. 7, 8).



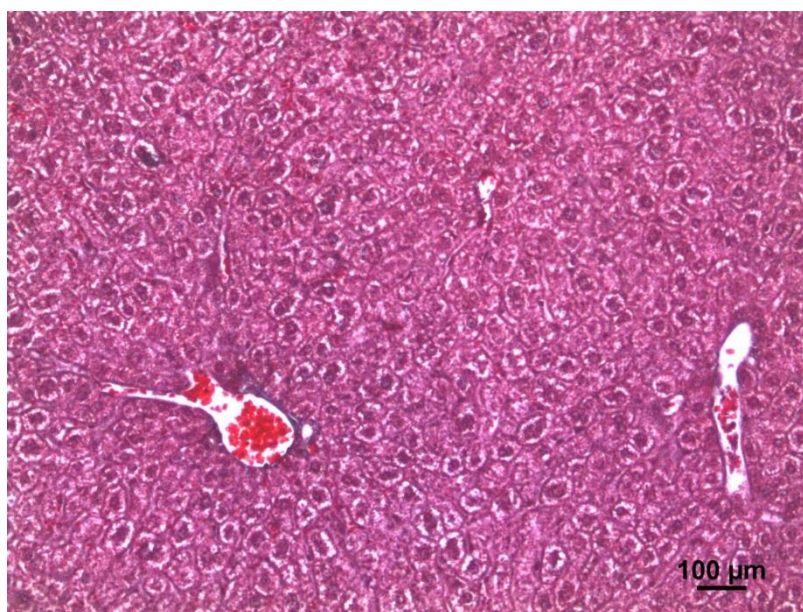
Obr. 5: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami *sol-Eng* krměných standardní dietou, barvení H&E.



Obr. 6: Reprezentativní obrázek jater transgenní skupiny myši *sol-Eng*⁺ krměných standardní dietou, barvení H&E.



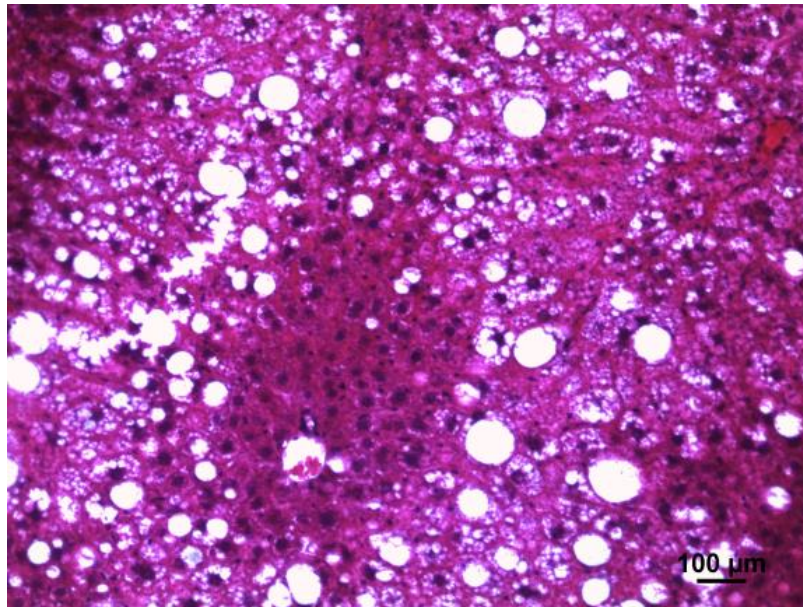
Obr. 7: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených standardní dietou, barvení zelený trichrom.



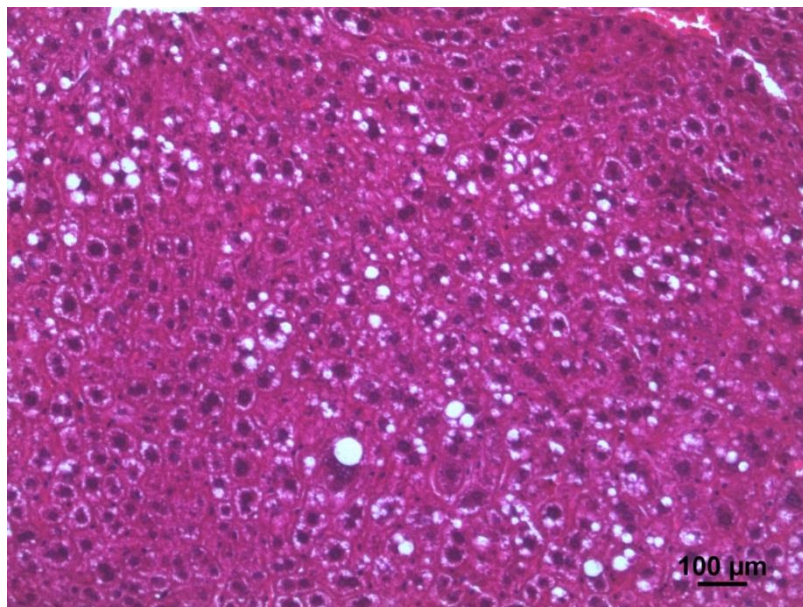
Obr. 8: Reprezentativní obrázek jater transgenní skupiny myši sol-Eng⁺ krmených standardní dietou, barvení zelený trichrom.

6.2 Vysokotuková dieta

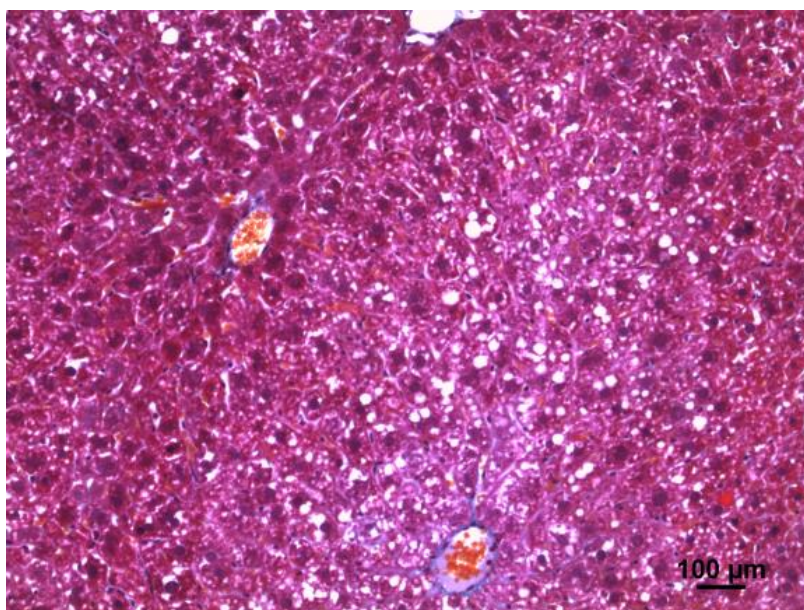
Podávání vysokotukové diety po dobu 3 měsíců vedlo k rozvoji výrazné steatózy v játrech u obou skupin myši (kontrolní vs *sol-Eng*⁺) (obr. 9, 10). Jak můžeme vidět na obr. 11, 12, ani v tomto případě nedošlo k rozvoji fibrózy ve skupině *sol-Eng*⁺.



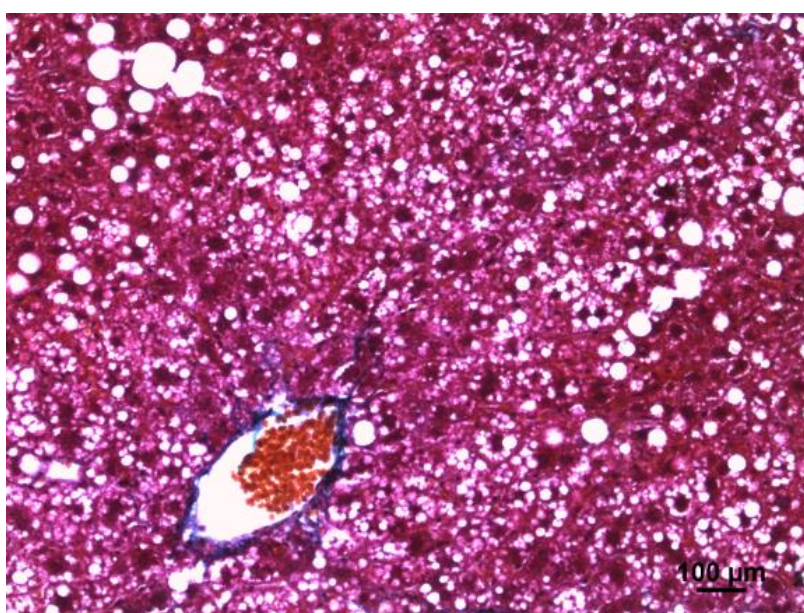
Obr. 9: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami *sol-Eng* krměných vysokotukovou dietou, barvení H&E.



Obr. 10: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši *sol-Eng*⁺ krměných vysokotukovou dietou, barvení H&E.



Obr. 11: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených vysokotukovou dietou, barvení zelený trichrom.



Obr. 12: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši sol-Eng⁺ krmených vysokotukovou dietou, barvení zelený trichrom.

7 DISKUZE

Solubilní forma endoglinu (*sol-Eng*) je štěpným produktem izoformy L – endoglinu. Toto zjištění bylo prokázáno po izolaci a analýze peptidové sekvence čistého cirkulujícího *sol-Eng* od pacientů s preeklampsii. *Sol-Eng* byl detekován v plazmě, séru a moči preeklamptických pacientů a u pacientů s nádorovým onemocněním (Venkatesha et al, 2006).

Jaterní fibróza a cirhóza jsou důsledky mnoha typů jaterních onemocnění. Jednou z příčin rozvoje jaterní fibrózy je nadměrná akumulace extracelulární matrix (ECM), která může vést až k jaternímu selhání (Bataller a Brenner, 2005). U myších modelů s jaterním poškozením *in vivo* a aktivovaných HSC *in vitro* byla zaznamenána vysoká stimulace exprese endoglinu (Meurer et al, 2005). HSC představují tedy zdroje kumulace ECM u jaterní fibrózy.

V patogenezi jaterní fibrózy má TGF- β roli významného pro-fibrogenního cytokinu. Jak již víme z předešlých studií, endoglin je koreceptor TGF- β . K rozvoji jaterní fibrózy značně přispívá TGF- β , který nejen že stimuluje produkci ECM svojí podpůrnou funkcí pro syntézu TIMPs, ale i přímou aktivací HSC (Brenner, 2009). Významným faktem bylo zjištění, že hladina endoglinu vzrůstá díky aktivaci HSC (Meurer, 2005). Z těchto faktů vyplývá, že endoglin hraje roli při rozvoji jaterní fibrózy.

Vysoké úrovně cirkulujícího *sol-Eng* byly pozorovány u pacientů s fibrotickými změnami v játrech. Nejvyšší hladiny *sol-Eng* byly stanoveny u pacientů, u kterých se vyskytovala HCV s rozsáhlou jaterní cirhózou (Rath et al, 2013). To by mohlo naznačovat, že tedy vysoké úrovně tohoto proteinu by mohly mít souvislost s jaterním poškozením. I přes všechna zjištění a poznatky zatím není známo, jak přesně je exprese *sol-Eng* v jaterních buňkách regulována. Nabízí se však otázka, zda vysoký výskyt solubilní formy endoglinu je příčinou vzniku těchto jaterních změn nebo zda jsou tyto vysoké hladiny naopak důsledkem.

V naší práci jsme zjistili, že u myší, které přijímaly standardní laboratorní dietu (chow) nebo vysokotukovou dietu a exprimovaly vysoké hladiny *sol-Eng*⁺, či nízké hladiny *sol-Eng*, se fibróza v žádném z případů nerozvinula, což nekorresponduje s dosavadními studiemi, kde u pacientů s cystickou fibrózou zaznamenali pomocí proteomické analýzy zvýšenou expresi endoglinu (Rath et al, 2013). Rovněž byly

vysoké hladiny solubilního endoglinu popsány u chronických onemocnění žlučového systému (Preativatanyou et al, 2010).

Nicméně, pro potvrzení našich závěrů bude potřeba dalšího hodnocení jak pomocí dalších histologických metod (např. imunohistochemických metod), tak na hlubší, molekulární úrovni (exprese proteinů, mRNA).

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vztah vysokých hladin *sol-Eng*⁺ samostatně nebo v kombinaci s vysokotukovou dietou, k rozvoji jaterní fibrózy u experimentálních myší. Po porovnání výsledků mikroskopických obrázků jater skupiny myší s vysokými hladinami *sol-Eng*⁺ v kombinaci s vysokotukovou dietou a skupiny myší s vysokými hladinami *sol-Eng*⁺ v kombinaci s normální (chow) stravou (myši s nízkými hladinami *sol-Eng* byly použity jako kontroly), jsme zjistili, že fibróza se ani v jednom z případů nerozvinula.

9 SEZNAM ZKRATEK

CF	cystická fibróza
CFLD	cystická fibróza spojená s jaterním onemocněním
CFTR	transmembránový regulátor vodivosti u cystické fibrózy
ECM	extracelulární matrix
<i>Eng</i>	endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
H&E	hematoxylin a eosin
HCV	hepatitida typu C
HFD	vysokotuková dieta
HHT – 1	hereditární (dědičná) hemoragická telangiektázie typu 1
HSC	jaterní hvězdicovité buňky
L – <i>Eng</i>	L – endoglin (long - dlouhý)
MFB	myofibroblasty
MMP	matrix metaloproteináza
S – <i>Eng</i>	S – endoglin (short – krátký)
<i>sol-Eng</i>	solubilní endoglin
<i>sol-Eng</i> ⁺	vysoké hladiny solubilního endoglinu
TGF-β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor)
TIMP – 4	tkáňový inhibitor metaloproteázy
TβRII	receptor růstového faktoru β typ II

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Portální (portobiliární) prostor.

Obr. 2: Trámce jaterních buněk a buňky ve stěnách sinusoid (schéma).

Obr. 3: Teritoriální uspořádání jaterních lalůčků, jaterních acinů a portálních lalůčků.

Obr. 4: Vznik solubilního endoglinu proteolytickým procesem z membránově vázaného endoglinu.

Obr. 5: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených standardní dietou, barvení H&E.

Obr. 6: Reprezentativní obrázek jater transgenní skupiny myši s vysokými hladinami sol-Eng⁺ krmených standardní dietou, barvení H&E.

Obr. 7: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených standardní dietou, barvení zelený trichrom.

Obr. 8: Reprezentativní obrázek jater transgenní skupiny myši s vysokými hladinami sol-Eng⁺ krmených standardní dietou, barvení zelený trichrom.

Obr. 9: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených vysokotukovou dietou, barvení H&E.

Obr. 10: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s vysokými hladinami sol-Eng⁺ krmených vysokotukovou dietou, barvení H&E.

Obr. 11: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s nízkými hladinami sol-Eng krmených vysokotukovou dietou, barvení zelený trichrom.

Obr. 12: Reprezentativní obrázek jater kontrolní skupiny myši s vysokými hladinami sol-Eng⁺ krmených vysokotukovou dietou, barvení zelený trichrom.

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Allinson KR, Carvalho RLC, van den Brink S, Mummery ChL a Arthur HM. Generation of a floxed allele of the mouse endoglin gene. *Genesis* [online]. 2007, **45**(6), 391-395. DOI: 10.1002/dvg.20284.
2. Arthur HM, Ure J, Smith AJH, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J a Diamond AG. Endoglin, an Ancillary TGF β Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. *Developmental Biology* [online]. 2000, **217**(1), 42-53. DOI: 10.1006/dbio.1999.9534.
3. Barbara NP, Wrana JL a Letarte M. Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor- Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(2), 584-594. DOI: 10.1074/jbc.274.2.584.
4. Bassyouni I, El-Shazly R, Azkalany G, Zakaria A a Bassyouni R. Clinical significance of soluble-endoglin levels in systemic lupus erythematosus: possible association with anti-phospholipid syndrome. *Lupus* [online]. 2012, **21**(14), 1565-1570. DOI: 10.1177/0961203312460115.
5. Bataller R a Brenner DA. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2005, **115**(2), 209-218. DOI: 10.1172/JCI200524282.
6. Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Markewitz B, Lewin S, Miller F, Chou L-S, Gedge F, Tang W, Coon H a Mao R. Genotype–phenotype correlation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Mutations and manifestations. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2006, **140A**(5), 463-470. DOI: 10.1002/ajmg.a.31101.
7. Bellone G, Gramigni C, Vizio B, Mauri FA, Prati A, Solerio D, Dughera L, Ruffini E, Gasparri G a Camandona M. Abnormal expression of Endoglin and its receptor complex (TGF- β 1 and TGF- β receptor II) as early angiogenic switch indicator in premalignant lesions of the colon mucosa. *International Journal of Oncology* [online]. 2010, **37**(5) 1153-1165. DOI: 10.3892/ijo_00000767.

8. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM a Quintanilla M. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2009, **1792**(10) 954-973. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.07.003.
9. Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, Maly, Smolej L, Zajic, Masin V, Zimova R a Rehacek V. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [online]. 2008, **197**(1) 264-270. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.022.
10. Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Sánchez-Rodríguez A, Lopez-Novoa JM a Martínez-Salgado C. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Medicine* [online]. 2010, **8**(1), 86. DOI: 10.1186/1741-7015-8-86.
11. Bordeau A, Dumont DJ a Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1999, **104**(10), 1343-1351. DOI: 10.1172/JCI8088.
12. Bordeau A, Faughnan ME, McDonald M-L, Paterson AD, Wanless IR a Letarte M. Potential Role of Modifier Genes Influencing Transforming Growth Factor- β 1 Levels in the Development of Vascular Defects in Endoglin Heterozygous Mice with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The American Journal of Pathology* [online]. 2001, **158**(6), 2011-2020. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64673-1.
13. Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* [online]. 2009, **120**, 361-368.
14. Burwen SJ, Schmucker DL, Jones AL. Subcellular and Molecular Mechanisms of Bile Secretion. [online]. **135**, 269-313. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62043-4.

15. Davidson B, Stavnes HT, FØrsund M, Berner A a Staff AC. CD105 (Endoglin) expression in breast carcinoma effusions is a marker of poor survival. *The Breast* [online]. 2010, **19**(6), 493-498. DOI: 10.1016/j.breast.2010.05.013.
16. Dooley J a Sherlock S. *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*. 12th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011, 771 s. ISBN 14-443-4128-6.
17. Faa, G, Liguori C, Columbano A a Diaz G. Uneven copper distribution in the human newborn liver. *Hepatology*[online]. 1987, **7**(5), 838-842. DOI: 10.1002/hep.1840070508.
18. Faa G, Sciot R, Farci AMG, Callea F, Ambu R, Congiu T, Eyken P, Cappai G, Marras A, Costa V a Desmet VJ. Iron concentration and distribution in the newborn liver. *Liver* [online]. 1994, **14**(4), 193-199. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1994.tb00073.x.
19. Faa G, Nurchi V, Demelia L, Ambu R, Parodo G, Congiu T, Sciot R, van Eyken P, Silvagni R a Crisponi G. Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. *Journal of Hepatology* [online]. 1995, **22**(3), 303-308. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80283-5.
20. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali PG, Altomonte M a Maio M. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* [online]. 2000, **6**, 2037-3043.
21. Gelfond D a Borowitz D. Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2013, **11**(4), 333-342. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.11.006.
22. Gougos A a Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* [online]. 1988, **141**(6), 1925-1933.

23. Hawinkels LJAC, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CFM a ten Dijke P. Matrix Metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-Mediated Endoglin Shedding Inhibits Tumor Angiogenesis. *Cancer Research* [online]. 2010, **70**(10), 4141-4150 . DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4466.
24. Haywood S. The non-random distribution of copper within the liver of rats. *British Journal of Nutrition* [online]. 1981, 45(02). DOI: 10.1079/bjn19810106.
25. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J a Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptro system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* [online]. 1992, **267**(27), 19027-19030.
26. Jonker L, Arthur HM, Costa C, Eichmann A, Bouvree K a Pardanaud L. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis: Unraveling the Diabetic Paradox. *Mechanisms of Development* [online]. 2002, **110**(1-2), 31-45. DOI: 10.1007/978-3-540-33177-3_2
27. Junqueira LCU, Carneiro J a Kelley RO. *Základy histologie*. 1. vyd. v ČR. Jinočany: H, c1997, 502 s. ISBN 80-857-8737-7.
28. Konrádová V, Uhlík J a Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H, 2000, 291 s. ISBN 80-860-2280-3.
29. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Büschenfelde KH a Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol*[online]. 1999, **276**, 1059-1068.
30. Lebrin F, Goumans M-J, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery Ch, Arthur HM a ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal* [online]. 2004, **23**(20), 4018-4028. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600386.

31. Ledvina M, Stoklasová A a Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 269 s. ISBN 978-802-4614-144.
32. Leeuwen L, Fitzgerald DA a Gaskin KJ. Liver Disease in Cystic Fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews* [online]. 2014, **15**(1), 69-74. DOI: 10.1016/j.prrv.2013.05.001.
33. Levine RJ, Lam Ch, Qian C, YU KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R a Karumanchi SA. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *New England Journal of Medicine* [online]. 2006, **355**(10), 992-1005. DOI: 10.1056/NEJMoa055352.
34. Li CG, Wilson PB, Bernabeu C, Raab U, Wang JM a Kumar S. Immunodetection and characterisation of soluble CD105-TGF β complexes. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1998, **218**(1-2), 85-93. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00118-5.
35. Li DY. Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. *Science* [online]. 1999, **284**(5419), 1534-1537. DOI: 10.1126/science.284.5419.1534.
36. Lopez-Novoa JM a Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*[online]. 2010, **299**(4), H959-H974. DOI: 10.1152/ajpheart.01251.2009.
37. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S a Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical Biochemistry* [online]. 2012, **45**(15), 1132-1144. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034.
38. Lüllman-Rauch R. *Histologie*. 1. české vyd. Překlad Radomír Čihák. Praha: Grada, 2012, 556 s. ISBN 978-802-4737-294.
39. MacSween RNM, Desmet VJ, Roskams T a Scothorne RJ. Developmental anatomy and normal structure. *Pathology of the Liver (MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ and Anthony PP, eds)*. 2002, **4**, 1-66.

40. Malarkey D, Johnson K, Ryan L, Boorman G a Maronpot R. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology* [online]. 2005, **33**(1), 27-34. DOI: 10.1080/01926230590881826.
41. Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM a Weiskirchen R. Identification of Endoglin in Rat Hepatic Stellate Cells: New insights into transforming growth factor receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(4), 3078-3087. DOI: 10.1074/jbc.M405411200.
42. Meurer SK, Alsamman M, Scholten D a Weiskirchen R. Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. *World J Biol Chem* [online]. 2014, **5**(2), 180-203.
43. Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E a Weiskirchen R. Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cellular Signalling* [online]. 2011, **23**(4), 683-699. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.12.002.
44. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Müller R a Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *International Journal of Cancer* [online]. 1999, **81**(4), 568-572. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990517)81:4<568::aid-ijc11>3.3.co;2-o.
45. Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim A-R a El-Emady YF. Alterations in circulating angiogenic and anti-angiogenic factors in type 2 diabetic patients with neuropathy. *Cell Biochemistry and Function* [online]. 2014, **32**(2), 155-163. DOI: 10.1002/cbf.2987.
46. Nachtigal P, Zemankova (Vecerova) L, Rathouska J a Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. 2012, **224**(1), 4-11. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001.

47. Park SO, Lee YJ, Nguyen HL, Han C, Choi EJ a Oh SP. ALK1 signaling plays a pivotal role in regulation of genes involved in angiogenesis and vascular tone: implication on the pathogenetic mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2 (HHT2). *FASEB J* [online]. 2008, **22**, 318.
48. Perlingeiro RCR. Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. *Development* [online]. 2007, **134**(16), 3041-3048. DOI: 10.1242/dev.002907.
49. Preativatanyou K, Honsawek S, Chongsrisawat V, Vejchapipat P, Theamboonlers A a Poovorawan Y. Correlation of Circulating Endoglin with Clinical Outcome in Biliary Atresia. *European Journal of Pediatric Surgery* [online]. 2010, **20**(04), 237-241. DOI: 10.1055/s-0030-1249695.
50. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM a Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *The Anatomical Record* [online]. 1954, **119**(1), 11-33. DOI: 10.1002/ar.1091190103.
51. Rath T, Hage L, Kügler M, Menendez K, Zachoval R, Naehrlich L, Schultz R, Roderfeld M, Roeb E a Hartl D. Serum Proteome Profiling Identifies Novel and Powerful Markers of Cystic Fibrosis Liver Disease. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(3), e58955-. DOI: 10.1371/journal.pone.0058955.
52. Rulo HFC, Westphal JR, van de Kerkhof PCM, de Waal RMW, van Vlijmen IMJJ a Ruitter DJ. Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. *Journal of Dermatological Science* [online]. 1995, **10**(2), 103-109. DOI: 10.1016/0923-1811(95)00397-B.
53. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N a Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* [online]. 1994, **134**(6), 2645-2657. DOI: 10.1210/endo.134.6.8194490.

54. Thein E, Becker M, Anetzberger H, Hammer C a Messmer K. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. *Journal of Applied Physiology* [online]. 2003, **95**(5), 1808-1816. DOI: 10.1152/jappphysiol.00362.2003.
55. Toporsian M. A Role for Endoglin in Coupling eNOS Activity and Regulating Vascular Tone Revealed in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation Research* [online]. 2005, **96**(6), 684-692. DOI: 10.1161/01.RES.0000159936.38601.22.
56. Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, ten Dijke P, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM a Rodriguez-Barbero A. L- and S-endoglin differentially modulate TGF 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *Journal of Cell Science* [online]. 2008, **121**(6), 913-919. DOI: 10.1242/jcs.023283.
57. Venkatesha S, Toporsian M, Lam Ch, Hanai J-I, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim K-H, Yuan H-T, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme V, Letarte M a Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine* [online]. 2006, **12**(6), 642-649 DOI: 10.1038/nm1429.
58. Yagmur E, Rizk M, Stanzel S, Hellerbrand C, Lammert F, Trautwein Ch, Washmuth HE a Gressner AM. Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. *European Journal of Gastroenterology* [online]. 2007, **19**(9), 755-761. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3282202bea.