

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



MIKROSKOPICKÁ STAVBA A MECHANICKÉ VLASTNOSTI
AORTY A PLICNICE

MICROSCOPIC STRUCTURE AND MECHANICAL
PROPERTIES OF AORTA AND PULMONARY ARTERY

Dizertační práce

Mgr. Tereza Kubíková

Školitel: doc. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D

Konzultant: Ing. Petra Kochová, Ph.D



Plzeň 2017

Bibliografické informace

Autor: Mgr. Tereza Kubíková

Název práce: Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Jazyk práce: český, anglický

Typ práce: Dizertační práce k získání akademického titulu Ph.D.

Univerzita: Univerzita Karlova

Fakulta: Lékařská fakulta v Plzni

Ústav: Ústav histologie a embryologie

Specializace: Anatomie, histologie, embryologie

Forma studia: prezenční

Školitel: doc. MUDr. et Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D

Konzultant: Ing. Petra Kochová, Ph.D

Datum odevzdání:

Počet stran:

Klíčová slova: mez pevnosti, mezní deformace, Youngův modul pružnosti, kolagen, elastin, chondroitinsulfát, kalcifikace, elastické tepny

Název práce v angličtině: Microscopic structure and mechanical properties of aorta and pulmonary artery

Klíčová slova v angličtině: ultimate stress, ultimate strain, Young's modulus of elasticity, collagen, elastin, chondroitin sulfate, calcification, elastic arteries

Předmluva a prohlášení

Tato práce byla vypracovaná na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy, pod vedením školitelů pana doc. MUDr. Mgr. Zbyňka Tonara, Ph.D., a paní Ing. Petry Kochové, PhD.

Práce je založena na několika studiích, na nichž jsem se podílela následujícím způsobem: Navrhla jsem design mikroskopické analýzy kreperezervovaných lidských alograftů aorty a plicnice a jejich chlopní, provedla jsem histologické zpracování a hodnocení všech vzorků v této studii, statisticky porovnála výsledky s daty z biomechanické analýzy a v neposlední řadě jsem vypracovala výsledkový článek.

U studie, zabývající se složením prasečí aorty v různých segmentech a v závislosti na stáří a u studie hodnotící *in vivo* použité nanovláknenné cévní náhrady, jsem se z části podílela na histologickém zpracování vzorků a na sepisování metodické části publikace.

Při sledování účinku a bezpečnosti katetrizační metody renální denervace jsem se podílela na návrhu histologického hodnocení, odběru a vzorkování materiálu, histologickém zpracování a na sepisování metodické části publikace.

Prohlašuji, že dizertační práci jsem vypracovala samostatně a všechny literární zdroje jsou řádně citovány. Předkládaná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. V textové části byly použity části předchozích článků autora, jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce. U publikací v příloze jsem 3krát první autorkou, 2krát korespondující autorkou a 3krát spoluautorkou.

Souhlasím se zapůjčováním práce.

Práci je možné nalézt na Oddělení pro vědu a vzdělání děkanátu Lékařské fakulty UK v Plzni.

V Plzni dne

.....

Abstrakt

Úvod: Předkládaná dizertace je souborem sedmi studií, jejichž společným cílem byl popis funkční histologie aorty a jejích některých větví, popř. popis plicnice. Práce se zaměřuje na analýzu mikroskopického složení různých segmentů celé prasečí aorty během ontogeneze jako často užívaného experimentálního modelu, lidských kryoprezervovaných vzorků aorty, plicnice a jejich chlopní, dále na hodnocení poškození renální tepny při její katetrizační denervaci a na hodnocení osídlení umělých cévních náhrad po implantaci štěpu do myši břišní aorty. Úvod podává přehled o stavbě aorty a plicnice a jejich chlopní, o vybraných onemocněních postihující velké tepny a o histologických a biomechanických metodách používaných pro jejich charakterizaci.

Metody: V práci jsme využili metody parafinových řezů s histologickým barvením, imunohistochemickým průkazem antigenů (α -hladký svalový aktin, desmin, vimentin, chondroitinsulfát, von Willebrandův faktor, neurofilamentový protein, tyrosin hydroxyláza) a biomechanické testy (jednoosé tahové zkoušky) k určení meze pevnosti, mezní deformace a Youngova modulu pružnosti. Ke kvantifikaci plošných podílů jednotlivých složek a k určení délkové hustoty elastinu v cévní stěně jsme použili stereologické metody založené na interakci testovacích mřížek o známých geometrických vlastnostech s mikrofotografiemi. K hodnocení míry poškození renální tepny ovčí po radiofrekvenční ablacii okolních nervů jsme použili námi modifikovaný semikvantitativní skórovací systém.

Výsledky: Prokázali jsme, že sestupná hrudní aorta prasete měla ze všech segmentů nejvyšší podíl elastinu, který se snižoval proximálně k oblouku aorty stejně jako distálně k břišní aortě. Podíl kolagenu ve stěně se snižoval od vzestupné aorty a aortálního oblouku směrem k sestupné aortě. Segmenty břišní aorty měly nejvyšší podíl aktinu, desminu a vimentinu a všechny tyto markery hladkých svalových buněk měly v hrudních segmentech aorty nižší hodnoty. Při srovnání suprarenální s infrarenální břišní aorty nebyly zjištěny žádné kvantitativní rozdíly. Plošný podíl aktinu v medii byl srovnatelný ve všech věkových skupinách a byl úměrný postnatálnímu růstu do sedmi měsíců věku. Segmenty aorty s větší tloušťkou měly větší podíl elastinu i kolagenu a menší podíl kontraktálních buněk než segmenty s menší tloušťkou. Ve vzorcích s menším podílem elastinu a větším podílem aktin- a desmin-pozitivních hladkých svalových buněk byly šroubovice hladkých svalových

buněk těsně navzájem uspořádány a byly více soustředěné než ve vzorcích s větším podílem elastinu a s menším podílem kontraktilních hladkých svalových buněk.

Elastická vlákna v tunica media aorty a plicnice člověka zůstala i po kryoprezervaci v tkáňové bance její hodnotnou složkou. Biomechanické vlastnosti kryoprezervované aorty a plicnice, jako je Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací a mezní deformace, mírně pozitivně korelovaly s tloušťkou intima-media. Mezní deformace mírně negativně korelovala s plošným podílem elastinu a plošným podílem kalcifikace v intima-media a mírně pozitivně korelovala s plošným podílem kolagenu ve stěnách aorty a plicnice. U cípů aortální a pulmonální chlopně slabě pozitivně korelovala tloušťka stěny s mezí pevnosti a Youngovým modulem v oblasti malých i velkých deformací.

Prokázali jsme, že použití vícebodového katetru při denervaci renální tepny vedlo k většímu poškození renální tepny a nervových pletení obklopující renální tepnu ve srovnání s jednobodovým katetrem. Avšak, žádný testovaný způsob denervace renální tepny nevedl k úplné ablaci nervů doprovázející renální tepnu.

Prokázali jsme, že hodnocené nanovláknenné nosiče u myši zastoupily po dobu šesti měsíců úlohu aorty, přičemž došlo k jejich postupné endotelizaci, k osídlení buňkami, ke vzniku rozvrstvení obdobnému intimě a medii skutečných elastických tepen, dále k diferenciaci buněk s kontraktilním fenotypem, k tvorbě a zrání kolagenu I a v některých případech i k tvorbě elastických lamel. Štěpy byly dobře snášeny a jejich průsvit byl průchodný.

Diskuze: Výsledky mechanických analýz kryoprezervovaných štěpů aorty, plicnice a jejich chlopní nemohly být zcela vysvětleny objemovými poměry hlavních tkáňových složek. Proto by měly být obě metody považovány za komplementární a měly by být použity v dalších studiích na zjištění použitelnosti kryoprezervovaných aort, plicnic a jejich chlopní a vlivu dlouhodobé kryoprezervace na jejich vlastnosti.

Účinnost a bezpečnost zkoumaných katetrů určených k denervaci renální tepny schválených pro klinické použití, se zdá být do značné míry závislá na anatomické interindividuální variabilitě stěny renální tepny a přilehlých nervových pletení.

Studie, zabývající se histologickým složením a biomechanickými vlastnostmi lidských či zvířecích velkých tepen, se prozatím soustředily na prvky mezibuněčné hmoty

jako je elastin, kolagen, hladké svalové buňky nebo glykosaminoglykany, ale opomíjeli další složky např. strukturální glykoproteiny, které zprostředkovávají vazby mezi buňkami a složkami mezibuněčné hmoty.

Kromě vlastních výsledků jednotlivých studií je v metodické části obsažena řada praktických postupů a doporučení s ohledem na způsoby víceúrovňového vzorkování při odběru a hodnocení materiálu, volbu barvicích metod a volbu mikroskopického zvětšení vhodného pro řešení konkrétních otázek.

Závěr: Za hlavní doménu histologických metod při studiu cévní stěny považujeme kvantitativní i kvalitativní popis mikroskopického složení přibližně v měřítku jednotek až tisíců mikrometrů, charakteristiku buněčných fenotypů, popis přestavby cévní stěny za různých podmínek a v neposlední řadě i popis rozložení a prostorových vztahů mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou. Největší přínos histologické analýzy spočívá především v poskytnutí informací o vzájemné pozici histologických struktur oproti technikám, analyzující homogenizované tkáňové vzorky využívané v biochemii a molekulární biologii. Propojení histologické analýzy s dalšími metodami, především biomechanickými je přínosné pro porozumění funkčních adaptací cévní stěny za různých podmínek.

Abstract

Introduction: This dissertation thesis consists of seven studies, the common aim of which was to describe the functional histology of the aorta and some of its branches, as well as the pulmonary artery. The thesis focuses on analysis of the microscopic composition of various segments of the porcine aorta during ontogenesis as an experimental model, as well as cryopreserved samples of human aorta, pulmonary artery and their valves. Further it assesses damage to the renal artery during its denervation, and evaluates cell colonization of synthetic vascular substitutes after their implantation into the abdominal aortas of mice. The introduction gives an overview of the structure of the aorta and pulmonary artery and their valves, selected diseases affecting large vessels, and histological and biomechanical methods used for their characterization.

Methods: We used the paraffin section method with basic and advanced stains, immunohistochemical detection of antigens (α -smooth muscular actin, desmin, vimentin, chondroitin sulfate, von Willebrand factor, neurofilament protein, tyrosine hydroxylase) and biomechanical tests (uniaxial tensile tests) for determination of ultimate strain, ultimate stress and Young's modulus of elasticity. We used stereological methods based on the interaction of test grids of known geometric properties with photomicrographs to quantify the area fraction of individual components and to determine the length density of elastic fibres in the vessel wall. We used a modified semiquantitative scoring test to evaluate the degree of damage to the ovine renal artery after radiofrequency ablation.

Results: We have shown that the porcine descending thoracic aorta had the highest area fraction of elastin, which decreased proximally to the aortic arch as well as distally to the abdominal aorta. The area fraction of collagen in the vessel wall decreased in the direction from the ascending aorta and the aortic arch towards the descending aorta. The abdominal aorta segments had the highest area fraction of actin, desmin and vimentin, and all of these smooth muscle markers had lower values in the aortic thoracic segments. There were no quantitative differences between the suprarenal and the infrarenal abdominal aorta. The area fraction of actin in the tunica media was comparable in all age groups and was proportional to postnatal growth up to seven months of age. Segments of the aorta with greater wall thickness had more elastin and more collagen and fewer contractile cells than

thinner segments. In the samples with more contractile vascular smooth muscle cells and less elastin, the symmetrical helices of vascular smooth muscle cells were arranged closer to each other and they were more concentrated than in samples with fewer actin- and desmin-positive vascular smooth muscle cells and more elastin.

Propagation of experimentally induced microcracks avoided elastic fibres. The biomechanical properties of cryopreserved aortas and pulmonary arteries, such as the Young's modulus of elasticity in the large deformation regions and ultimate strain, all correlated positively with the thickness of the intima-media. The ultimate strain negatively correlated with the area fraction of elastin and the area fraction of calcification in the intima media and positively correlated with the area fraction of collagen in the wall of the aorta and pulmonary artery. Wall thickness correlated positively with the ultimate stress and Young's modulus in the small and large deformation regions in the cusps of aortic and pulmonary valves.

We have shown that using the single-point ablation catheter resulted in greater damage to the renal artery and the nerves surrounding it compared with the multi-point ablation catheter. Neither procedure of renal denervation led to complete ablation of nerves surrounding the renal artery.

Finally, we have demonstrated that the evaluated nanofibrous scaffolds in the mouse have successfully substituted for the role of the aorta for six months with gradual endothelization, cell colonization, formation of layers similar to the intima and media of actual elastic arteries, differentiation of cells with contractile phenotype, formation and maturation of collagen I and, in some cases, the formation of elastic lamellas. The scaffolds did not induce any inflammatory reaction and had freely passable vascular lumina.

Discussion: Studies of histological composition and biomechanical properties of human or animal large arteries have so far focused on elements of the extracellular matrix such as elastin, collagen, smooth muscle cells or glycosaminoglycans, but have omitted other components such as structural glycoproteins that mediate bonds between cells and extracellular components.

In addition to the results of the individual studies, the methodological part contains a number of practical procedures and recommendations with regard to the methods of

multilevel sampling and evaluation of materials, the choice of staining methods and the choice of microscopic magnification suitable for addressing specific questions.

Conclusion: The results of mechanical analysis of cryopreserved aortas, pulmonary artery and their valves could not be completely explained by the quantified histological parameters of the major tissue components. Therefore, the two methods should be considered complementary and should be used together in future studies to determine the usability of cryopreserved aortas, pulmonary arteries and their valves and the effects of long-term cryopreservation on their properties.

The safety and efficacy of investigated catheters used for denervation of the renal artery appear to be largely dependent on the interindividual anatomical variability of the wall of the renal artery and adjacent nerve plexus.

We consider the main contribution of histological methods in the study of the vascular wall to be the quantitative and qualitative description of the microscopic composition in the range of ones to thousands of micrometers, characteristics of cell phenotypes, description of reconstruction of the vessel wall under various conditions, and description of the distribution and spatial relations between the cells and the extracellular matrix. The greatest benefit of histological analysis over techniques analyzing homogenized tissue samples used in biochemistry and molecular biology is, especially, providing information on the reciprocal position of histological structures. Linking histological analysis with other methods, especially biomechanical, is beneficial for understanding the functional adaptations of the vascular wall under various conditions.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem těm, kteří se větší či menší měrou podíleli na vzniku této práce, která je výsledkem velkého úsilí. Především bych chtěla poděkovat svým školitelům, panu doc. MUDr. Mgr. Zbyňkovi Tonarovi, Ph.D., za jeho odborné rady a neocenitelnou pomoc při překonávání překážek, především při publikační činnosti a za to, že si vždy našel čas, aby mě vyslechl a poradil, jak dál, a paní Ing. Petře Kochové, Ph.D., která se mě snažila zasvětit do tajů mechaniky biologických tkání a provedla veškeré mechanické měření vzorků, použitých při studiích zmiňovaných v této práci. Ráda bych poděkovala vedoucí Ústavu histologie a embryologie paní prof. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D., která mi vytvořila skvělé podmínky pro studium a profesní rozvoj a vždy mi vyšla vstříc.

Dále bych ráda poděkovala za spolupráci a za vzorky pro naše studie, a to konkrétně paní Priv.-Doz. Dr.med.vet. Kirsti Witter, Ph.D., z Veterinärmedizinische Universität Wien za sběr vzorků prasečí aorty; panu MUDr. Jaroslavu Špatenkovi, CSc., z Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol za kryoprezervované vzorky lidských alograftů aortálních a pulmonálních chlopní, panu MVDr. Liboru Kopkanovi, Ph.D., z Centra experimentální medicíny IKEM za vzorky renálních tepen po radiofrekvenční ablacii a také paní RNDr. Janě Horákové, Ph.D., z Katedry netkaných textilií a nanovláknenných materiálů TU v Liberci za vzorky nanovláknenných cévních náhrad po implantaci do myší břišní aorty.

Mé díky patří také méjí rodině, která mě podporovala během celého studia a mému partnerovi Ing. Martinovi Blassovi za pochopení, podporu, jeho nápady a za jazykovou korekturu rukopisu a většiny publikací.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK.....	13
2	TEORETICKÝ ÚVOD.....	15
2.1	Mikroskopické složení stěny elastických tepen.....	15
2.2	Vývoj aorty.....	21
2.3	Složení aortální a pulmonální chlopně.....	22
2.4	Složení viscerálních větví aorty.....	23
2.5	Vybraná nemocnění cévní stěny.....	23
2.6	Vybraná onemocnění aortální a pulmonální chlopně.....	27
2.7	Histologická analýza elastických tepen.....	28
2.8	Mechanické testování elastických tepen.....	34
2.9	Aorta jako model v tkáňovém inženýrství.....	36
3	CÍLE A HYPOTÉZY.....	38
3.1	Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří.....	39
3.2	Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete.....	40
3.3	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice.....	40
3.4	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně.....	41
3.5	Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici.....	41
3.6	Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů.....	41
3.7	Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci.....	42
4	MATERIÁLY A METODY.....	43
4.1	Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří.....	43
4.2	Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete.....	44
4.3	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice.....	46
4.4	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně.....	49
4.5	Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici.....	50
4.6	Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů.....	52
4.7	Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci.....	57
5	VÝSLEDKY.....	60
5.1	Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří.....	60
5.2	Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete.....	67
5.3	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice.....	68

5.4	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně	71
5.5	Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici	74
5.6	Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů	74
5.7	Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci	80
6	DISKUZE	87
6.1	Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří	87
6.2	Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete.....	91
6.3	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice.....	91
6.4	Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně	92
6.5	Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici	94
6.6	Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů	94
6.7	Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci	96
7	ZÁVĚRY PRÁCE	97
8	LITERATURA.....	100
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	115
10	SEZNAM TABULEK	117
11	PUBLIKACE AUTORKY.....	118
11.1	Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce	118
11.2	Publikace autorky nevztahující se k tématu dizertační práce.....	119
12	SEZNAM PŘÍLOH	121

1 Seznam zkratek

<i>a</i>	- konstanta bodové testovací mřížky, plocha příslušející jednomu bodu sítě
<i>A</i>	- plocha [m ²]
<i>A_A</i>	- area fraction – plošný podíl hodnocené složky v referenční ploše vzorku
AAA	- abdominal aortic aneurysm – aneurysma (výduť) břišní aorty
AGEs	- advanced glycation end products (konečné produkty pokročilé glykace)
ANOVA	- analysis of variance - analýza variace nebo její neparametrická obdoba
CD	- cluster of differentiation
CE	- coefficient of error – koeficient chyby
CS	- chondroitinsulfát
DAPI	- 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
<i>E</i>	- Youngův modul pružnosti [Pa]
ECM	- extracellular matrix – mezibuněčná hmota
EMILIN-1	- elastin microfibril interface located protein
<i>f</i>	- obecné označení pro podíl konečného výběru hodnoceného objemu v celkovém objemu vzorku
<i>F</i>	- síla [N]
GAG	- glykosaminoglykany
Gly	- glycin (aminokyselina)
HA	- kyselina hyaluronová
HLys	- hydroxylysin (aminokyselina)
HPro	- hydroxyprolin (aminokyselina)
IMT	- intima-media thickness – tloušťka tunica intima a media
<i>l</i>	- délka [m]

L_A	- délková hustota profilů objektů v řezu [m^{-1}]
LDL	- low-density lipoprotein - lipoprotein o nízké hustotě
NO	- oxid dusnatý
p	- počet průsečíků testovací mřížky s hodnoceným objektem
p-hodnota	- mezní hladina významnosti statistických testů
PAS	- periodic acid Schiff
PCL	- polykaprolaktanová kyselina
PGA	- polyglykolová kyselina
PLA	- polylaktidová kyselina
Pro	- prolin (aminokyselina)
P_L	- teoretická hustota průsečíků sledované složky s profilem trhliny
P'_L	- skutečná hustota průsečíků sledované složky s profilem trhliny
Q_A	- počet profilů objektů v řezu o ploše A [m^{-2}]
SMCs	- smooth muscle cells - hladké svalové buňky
TGF- β	- transforming growth factor β – transformující růstový faktor β
WT	- wall thickness - tloušťka celé stěny cévy
σ	- normálové napětí [Pa]
ε	- relativní prodloužení (deformace) [-]
κ	- míra koncentrace von Misesova rozdělení
$I_0(\kappa)$	- modifikovaná Besselova funkce prvního druhu
μ	- míra polohy von Misesova rozdělení

2 Teoretický úvod

2.1 Mikroskopické složení stěny elastických tepen

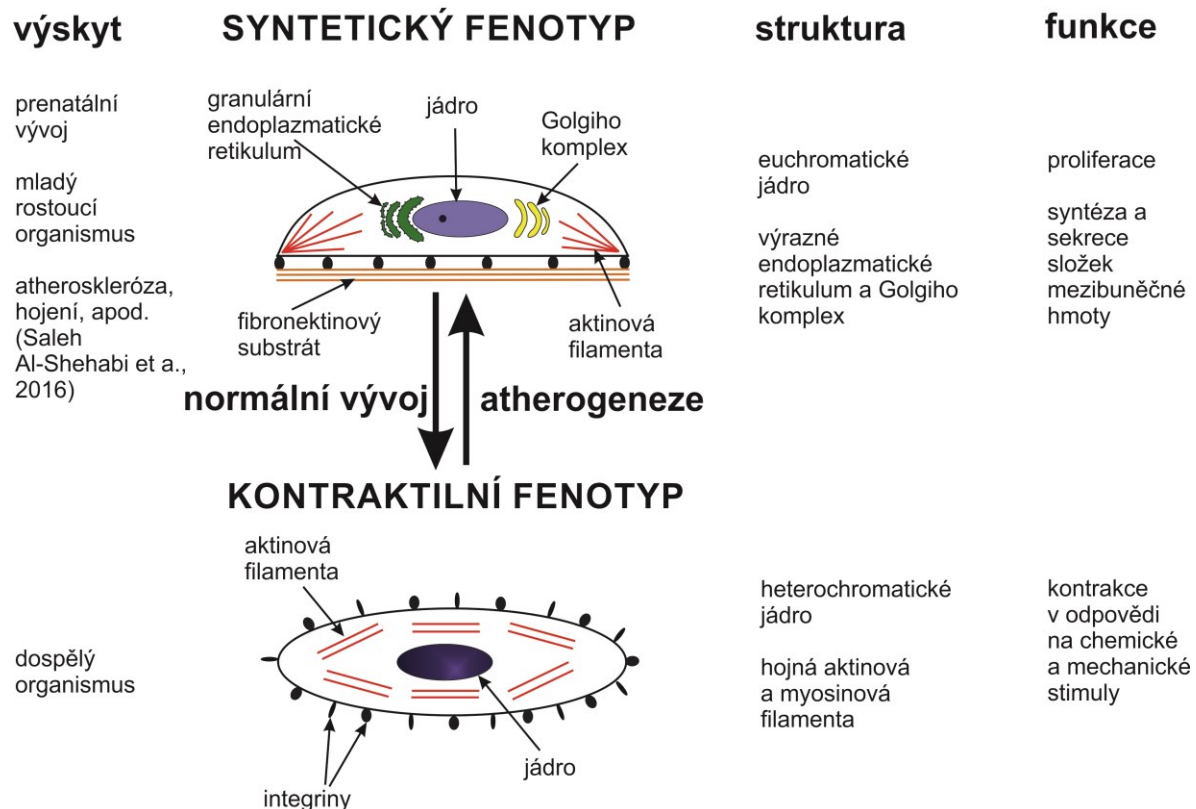
Stěna elastických tepen je členěna na tunica intima, media a adventitia. Průsvit elastických tepen je vystlán endotelovými buňkami. Ty spolu se subendotelovým vazivem, tvoří tenkou vrstvu tunica intima. Tunica media je nejsilnější vrstvou a obsahuje především hladké svalové buňky, elastické lamely a další složky mezibuněčné hmoty (ECM), jako jsou kolagenní vlákna a základní hmota. Vnější vrstva tunica adventitia je tvořena řídkým kolagenním vazivem s vasa vasorum a nervi vasorum. Mezi vnější vrstvou tunica adventitia a tunica media se může nacházet navíc kompaktní vrstva, obsahující velké množství elastických vláken (Witter et al., 2017). Předchozí studie ukazují, že tloušťka lidské plicnice je $1,5 \pm 0,3$ mm a tloušťka vzestupné části lidské aorty je $2,1 \pm 0,4$ mm (Azadani et al., 2012).

2.1.1 Hladké svalové buňky

Vaskulární hladké svalové buňky (vascular smooth muscle cells - SMCs) mají vřetenovitý tvar a oválné jádro. Mimo oblasti výskytu vodivých spojů je sarkolema hladkých svalových buněk obalena bazální membránou, jež se skládá z kolagenu typu IV, multiadhesivního glykoproteinu lamininu a proteoglykanu perlekanu a heparansulfátu (Ross and Pawlina, 2016). Hladké svalové buňky se mohou nacházet mezi dvěma hraničními fenotypy, kontraktilním a syntetickým fenotypem, obr. 1. Bazální membrána, obklopující hladké svalové buňky, pomáhá udržet kontraktilní fenotyp, tzn. bohatou přítomnost myofilament a jádro s převažujícím heterochromatinem. Přetvoření komponent bazální membrány, např. metaloproteinázami (Newby, 2006), vede k vazbě interginu na povrchu hladkých svalových buněk s fibronectinem a kolagenem typu I, což vede ke změně fenotypu z kontraktilního na syntetický (Hedin et al., 1988; Yamamoto et al., 1993). Tento proces zahrnuje ztrátu myofilament, jádro s převahou euchromatinu a zmnožení granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu, organel pro syntézu složek mezibuněčné hmoty (Thyberg et al., 1990). Cytoplazma hladkých svalových buněk

Teoretický úvod

obsahuje kontraktilní a intermediální filamenta. Kontraktilní aparát tvoří tlustá myosinová a tenká aktinová filamenta (Ross and Pawlina, 2016). Pro změnu fenotypu je také charakteristický posun v expresi aktinu, myosinu, tropomyosinu, desminu a vimentinu. V buňkách s kontraktilním fenotypem jsou dominantní α -isoforma aktinu, svalový myosin, tropomyosin a desmin. Naopak při syntetickém fenotypu převládá β -isoforma a γ -isoforma aktinu, nesvalový (cytoskeletální) myosin a vimentin (Thyberg et al., 1990). Mechanická deformace zvyšuje sekreční funkci hladkých svalových buněk, což vede ke zvýšení produkce mezibuněčné hmoty (Williams, 1998). Aktin, desmin a vimentin mohou být detekovány pomocí některých protilátek, jejichž reakce jsou dobře standardizované (Witter et al., 2010; Eberlová et al., 2013; Houdek et al., 2013). Zviditelněná reakce protilátky s antigenem může sloužit pro kvantitativní stanovení plošného podílu aktinu, desminu či vimentinu v hladkých svalových buňkách (Tonar et al., 2015a).



Obr 1. Schematický přehled základních rozdílů mezi fenotypy hladkých svalových buněk (upraveno podle Thyber et al., 1990).

Hladké svalové buňky se vyznačují širokou hysterezní smyčkou, tzn. velkou ztrátou energie v cyklu zatížení a uvolnění, modulem pružnosti v tahu v rozmezí 15–25 kPa a výraznou relaxací tzn., že k udržení konstantní deformace v čase je potřeba stále nižší energie (Slažanský, 2014). Zvýšená elastická tuhost hladkých svalových buněk může vést ke zvýšení celkové tuhosti aortální nebo tepenné stěny u hypertenze (Sehgel et al., 2013).

2.1.2 Mezibuněčná hmota

Vláknitou složku mezibuněčné hmoty i její základní (amorfní) hmotu produkují hladké svalové buňky přítomné ve stěně elastických tepen (Shadwick, 1999).

Elastin, stejně jako kolagen, je protein bohatý na prolin a glycin. Na rozdíl od kolagenu je chudý na hydroxyprolin a zcela chybí hydroxylysin. Náhodná distribuce glycinu a vyšší zastoupení hydrofobních aminokyselin způsobuje hydrofobní vlastnosti elastinu a umožňuje jeho náhodné vinutí. Elastin rovněž obsahuje dvě aminokyseliny, desmosin a isodesmosin, typické právě pro elastin, jež jsou zodpovědné za příčné kovalentní vazby, tzv. cross-link, mezi molekulami elastinu (Ross and Pawlina, 2016). Polymerní řetězce aminokyselin jsou vůči sobě pohyblivé mimo míst výskytu kovalentních vazeb. U elastických tepen je elastin přítomný především v tunica media ve formě fenestrovaných lamel, mezi nimiž se nachází hladké svalové buňky a kolagenní vlákna. V tzv. lamelární jednotce se střídají elastická lamela-hladká svalová buňka-elastická lamela-kolagenní vlákna (Clark and Glagov, 1985). Tyto lamelární jednotky na sebe přímo navazují. Počet a tloušťka lamel je závislá na věku jedince. Při narození aorta téměř postrádá lamely, u dospělého člověka jich vzestupná hrudní aorta obsahuje 40 až 70. Tloušťka a počet lamel vzrůstá u pacientů s hypertenzí (Ross and Pawlina, 2016). Množství elastických lamel v medii klesá směrem od vzestupné aorty po bifurkaci aorty (Braunwald and Bonow, 2012). Počet elastických lamel v aortě roste s tělesnou velikostí daného živočišného druhu (Shadwick, 1999). Spojovacími pásy mezi kolagenními a elastickými vlákny je zajištěna pevnost. Lamelární uspořádání rozděluje zatížení rovnoměrně přes stěnu a vyhlazuje cyklické tlakové vlny při srdeční kontrakci (Mills, 2012). Elastin omezuje bujení, růst a migraci hladkých svalových buněk (Xu and Shi, 2014), udržuje je

Teoretický úvod

v kontraktilním fenotypu (Yamamoto et al., 1993). S přibývajícím věkem ubývá poměr elastinu ve stěně elastických cév a mírně se snižuje obsah desmosinu a isodesmosinu. S věkem se také zvyšuje obsah histidinoalaninu, který způsobuje zesíťování kolagenu a elastinu a tím pádem ztrátu pružnosti (Tsamis et al., 2013). Poločas rozpadu elastinu je 40 let (Xu and Shi, 2014) může být však urychlen v přítomnosti zánětu, kdy jsou uvolňovány elastázy z makrofágů a neutrofilů. Aortální výduť (aneurysma) je stav charakteristický degradací elastinu, ztrátou hladkých svalových buněk a zvýšeným množstvím kolagenních vláken ve stěně aorty (Chow et al., 2013). Degenerace elastinu s věkem způsobuje zvýšení rigidity. To se projevuje zvýšením rychlosti pulzní vlny, kterou se měří tuhost velkých tepen. Elastin je z mechanického hlediska velice poddajný, má roztažnost až 70 % a modul pružnosti v tahu přibližně 70 kPa (Slažanský, 2014)

Kolagen je tvořen třemi polypeptidy, známými jako α -řetězce, tvořícími pravotočivou trojšroubovici. Každá třetí aminokyselina v řetězci je glycin (Gly). Hydroxylysin (HLys) a hydroxyprolin (HPro) opakovaně předchází glycinu v řetězci. Prolin (Pro) naopak často v řetězci následuje za glycinem. V α -řetězcích jsou tedy dominantní následující uspořádání aminokyselin Gly-Pro-X nebo Gly-X-HPro/HLys (Szpak, 2011). Tato posloupnost je nezbytná pro soudržnost trojšroubovice tropokolagenu. Dosud je popsáno přibližně 29 typů kolagenu lišících se typem svých řetězců a chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Ross and Pawlina, 2016). V elastických tepnách lze nalézt kolagen ve formě vláken ve všech třech vrstvách jejich stěn, 80-90 % kolagenu tvoří kolagen typu I a III (Berillis, 2013). Směr kolagenních vláken v tunica media aorty je spíše cirkulární než podélný. Orientace jader hladkých svalových buněk vzájemně koreluje s orientací kolagenních vláken (Horny et al., 2010). Kolagen typu IV a V se nachází v bazální lamině endotelových a hladkých svalových buněk (Berillis, 2013). Přítomnost kolagenu typu III ve stěně aorty zvyšuje flexibilitu kolagenních fibril (Silver et al., 2001). Kolagen typu III je formován do tenkých vláken a má větvenou strukturu oproti kolagenu typu I, jež tvoří silná kolagenní vlákna. S přibývajícím věkem množství kolagenu a elastinu v aortě klesá. Naopak se po 45. roce života zvýšila jejich koncentrace. To naznačuje ještě větší ztrátu jiné složky mezibuněčné hmoty (Cattell et al., 1996). Zvýšená rigidita plicnice je připisována spíše zvýšenému množství kolagenu než jeho zesíťování (Wang and Chesler, 2012). Vysoká exprese lysyl oxidázy zvyšuje zesíťování kolagenu a tuhost

Teoretický úvod

kolagenu. Transformující růstový faktor- β se podílí na ukládání kolagenu prostřednictvím stimulace syntézy mezibuněčné hmoty a snížení degradace kolagenu (Xu and Shi, 2014). Kolagen typu I podporuje přechod fenotypu hladkých svalových buněk ve prospěch syntetického fenotypu (Yamamoto et al., 1993). Kolagenní vlákna jsou nejtuzší součástí cévní stěny, jejich tažnost se pohybuje v rozmezí 2-4 % a modul pružnosti v tahu v jednotkách GPa (Slažanský, 2014).

Sušina aorty obsahuje 20 % hladkosvalových proteinů a 60 % kolagenních a elastických vláken, přičemž více elastických vláken je v hrudní aortě a v břišní aortě převládá kolagen (Silver et al., 2001). U prasečí aorty je stejný trend jako u lidské aorty (Tonar et al., 2015a).

Proteoglykany představují řadu geneticky vzájemně nepříbuzných rodin proteinů, které mají kovalentně připojené glykosaminoglykanové řetězce. Nejvíce zastoupené proteoglykany v cévní stěně mohou být rozděleny na velké proteoglykany, tvořící objemné agregáty interakcí s kyselinou hyaluronovou, a na malé proteoglykany bohaté na leucin. Versican je největší proteoglykan, jež se nachází v tunica intima a media. Versican vyvolává buněčné adheze, podporuje bujení, růst a migraci buněk. Malé proteoglykany bohaté na leucin neinteragují s kyselinou hyaluronovou, ale místo toho vážou molekuly mezibuněčné hmoty jako je kolagen, elastin a fibronectin (Wagenseil and Mecham, 2009). Mezi takové glykoproteiny patří decorin, který se váže nekovalentně na povrch vláknitého kolagenu typu I (Scott and Orford, 1981), a zpomaluje rychlost a stupeň fibrilogeneze kolagenu (Vogel and Trotter, 1987). Glykosaminoglykanový řetězec decorinu prochází příčně od sousedních kolagenových vláken, čímž udržuje interfibrilární mezery (Scott, 1988). Koordinovaná exprese decorinu a kolagenů je důležitá pro řádné uspořádání mezibuněčné hmoty (Danielson et al., 1997). Decorin rovněž reguluje tvorbu šroubovitých vláken kolagenu typu III, které jsou charakteristické pro normální elastickou mezibuněčnou hmotu (Thieszen and Rosenquist, 1995). S přibývajícím věkem přibývá decorinu a elastáz, což negativně ovlivňuje elastická vlákna (Fornieri et al., 1999). Mimo jiné decorin váže hydroxyapatit a podporuje tak kalcifikaci intimy (Fischer, 2004), k níž dochází s věkem nebo např. při hyperkalcémii. Dalšími malými proteoglykany bohatými na leucin jsou lumican a biglycan, které rovněž regulují fibrilogenezi kolagenu (Wagenseil and Mecham,

2009). Proteoglykany jsou hlavní objemovou složkou tunica intima tepen, vyplňují přibližně 60 % (Camejo et al., 1998).

Glykosaminoglykany (GAG) jsou silně hydrofilní, tuhé, nevětvené polysacharidové řetězce, které nejsou schopné se svinout do kompaktních struktur jako polypeptidické řetězce. Glykosaminoglykany mají tendenci tvořit rozvinuté struktury a zaujímat tak v porovnání s jejich hmotností velký objem. Proto jsou schopné i při nízkých koncentracích tvořit propustné hydratované gely a zajišťovat tak mechanickou oporu tkáně. Glykosaminoglykany tvoří 2-5 % sušiny elastických tepen a významně přispívají k morfogenezi, homeostáze a patogenezi tepen. Ve stěně tepen nacházíme především, kyselinu hyaluronovou, heparansulfát, chondroitinsulfát a dermatansulfát. Chondroitinsulfát (CS), resp. versican a biglycan, ve kterých je navázán, inhibuje elastogenezi (Hwang et al., 2008).

Glykoproteiny, jako je multiadhesivní fibronectin, podporují buněčnou adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci buněk mezibuněčné hmoty. Fibronectin je produkován různými typy buněk, především fibroblasty, ale také hladkými svalovými buňkami a myofibroblasty. Fibronectin mění průměrné napětí a modul pružnosti cévy, sdružuje se s vaskulárními hladkými svalovými buňkami a skrz integrinové receptory umožňuje detekci a reakci na mechanické síly (Xu and Shi, 2014). Dalšími glykoproteiny produkovány endotelovými buňkami jsou von Willebrandův faktor a P-selektin. Jsou skladovány uvnitř těchto buněk v tzv. Weibel-Paladeových částicích. Von Willebrandův faktor přispívá především k adhezi a agregaci krevních destiček v místě poranění cév a nese koagulační faktor VIII (Lenting et al., 2015). P-selektin napomáhá adhezi leukocytů na endoteliální buňky a migraci leukocytů z krevního řečiště do místa zánětu v pojivové tkáni (McEver, 2015). Perlekan je další glykoprotein vyskytující se ve stěně cév, kde přispívá k pevnosti stěny. Perlekan spolu s kolagenem typu IV a lamininem omezuje růst hladkých svalových buněk a zvyšuje jejich kontraktilní genovou expresi, redukuje zánětlivou genetickou expresi, redukuje absorpci lipoproteinu o nízké hustotě (LDL) a inhibuje kalcifikaci mezibuněčné hmoty (Xu and Shi, 2014). Fibrilin-1 je glykoprotein vyskytující se ve formě jemných mikrofibril. Tyto mikrofibrily slouží jako lešení při výstavbě elastických vláken, elastogenezi. Výsledkem nepřítomnosti fibrilinu-1 během elastogeneze je tvorba elastických lamel, přítomných v elastických tepnách (Ross and Pawlina, 2016).

Elastin microfibril interface located protein (EMILIN-1) je další glykoprotein asociovaný s elastickými mikrofibrilami. Stejně jako fibrilin-1 je důležitý pro správnou elastogenezi. Myši postrádající gen pro EMILIN-1 trpěly hypertenzí a jejich tepny měly nepravidelné elastické lamely, menší průměr a silnější stěnu (Wagenseil and Mecham, 2009).

2.2 Vývoj aorty

První cévy se vyvíjí ve stěně žloutkového váčku a ductus omphaloentericus již od konce 2. týdne. Vaskulogenezi označujeme vznik primitivní krevní cévy *de novo* v mezenchymu z tzv. krevních ostrůvků. Buňky ostrůvků se diferencují v povrchové angioblasty a uvnitř uložené hemocytoblasty. Hemocytoblasty dávají vznik primitivním embryonálním krvinkám. Angioblasty se protahují do délky a mění v buňky endotelu. Tvorba cév z již založených cév je označována jako angiogeneze (Vacek, 2006).

Průsvit cév se vyvíjí extracelulárně mezi sousedními endotelovými buňkami. Endotelové buňky se vzájemně spojují. K určení jejich luminálního buněčného povrchu přispívají moesin, CD34-sialomucin (člen rodiny průchodových sialomucinových proteinů), F-aktin a nekontraktilní myosin II, jež se nachází v mezibuněčném kontaktu. Výsledné změny ve tvaru endotelových buněk vedou k tvorbě průsvitu. Místní exprese vaskulárních endotelových kadherinů je nezbytná k lokalizaci CD34-sialomucinů na kontaktu endoteliálních buněk, což je předpoklad pro zapojení moesinu a F-aktinu. Dalším faktorem pro interakci F-aktinu a nekontraktilního myosinu II a ke změně tvaru endoteliálních buněk je vaskulární endotelový růstový faktor-A (Strilić et al., 2009).

Brzy po vzniku základů cév ve stěně žloutkového váčku začnou vznikat krevní ostrůvky v mezenchymu choria, stvolu a vlastním těle zárodku (Vacek, 2006). Krevní ostrůvky jsou zpočátku vzájemně oddělené. Později pupeny povrchového endotelu prostupují do okolí, až se postupně spojí v souvislou síť. Z této sítě se postupně vytváří tepny a žíly pod vlivem hemodynamických a genetických faktorů a vzniká tak primitivní krevní oběh. Tento oběh je tvořen z primitivního oběhu embryonálního a ze dvou oběhů extraembryonálních (vitelinní a umbilikální) (Kapeller and Pospíšilová, 1991). Primitivní oběh embryonální je složen z primitivní srdeční trubice, ze které kranálně vybíhá truncus

arteriosus a do níž kaudálně vtékají tři žíly. Truncus arteriosus se během 4. týdne rozvětňuje v šest párů aortálních oblouků, které probíhají v jednotlivých žaberních obloucích a dorzálně se spojují ve dvě dorzální sestupné aorty, pravostrannou a levostrannou. Z těch později vyrůstají do tělní stěny parietální a viscerální větve. Obě dorzální aorty záhy splynou v jediný kmen sestupné aorty a níže břišní aorty (Vacek, 2006). V průběhu dalšího vývoje je výtokový trakt srdce rozdělen na ventrální aortu a truncus pulmonalis (Sadler, 2011). U 3., 4. a 6. aortálního oblouku se pravá a levá strana vyvíjí asymetricky. U savců se 4. aortální oblouk na levé straně zvětšuje na úkor pravého. Levostranný 4. aortální oblouk dává vzniknout oblouku aorty a z levé primitivní vzestupné aorty vzniká vzestupná aorta (Vacek, 2006). Ze 6. aortálního oblouku se vyvíjí arteria pulmonalis dextra a sinistra a ductus arteriosus (Sadler, 2011).

Histogeneze aorty savců vychází z indiferentního stádia, ve kterém je stěna tvořena pouze endotelem (u člověka do 5. týdne). Kolem endotelu se postupně soustřeďují další mezenchymální buňky, které se dále diferencují ve fibroblasty a myoblasty. Diferenciace stěny je doprovázena přibýváním kolagenních vláken a elastických membrán. Od 4. měsíce lze rozlišit základ tří vrstev – tunica intima, media a adventitia (Kocová and Tesar, 1979). Vývoj jednotlivých elementů cévní stěny je studován jak u člověka (Horká and Pohunková, 1990; Kolpakov et al., 1993; Sosa-Melgarejo and Berry, 1995), tak i u jiných savců, např. u myši (Strilić et al., 2009), ale i bezobratlých (Kucera et al., 2009).

2.3 Složení aortální a pulmonální chlopně

Aortální a pulmonální chlopně jsou tvořeny třemi cípy, které jsou ukotveny v prstenci vazivové tkáně (anulus aorticus/ anulus trunci pulmonalis). Cípy chlopní mají poloměsíčitý tvar a jsou obvykle tenčí než 1 mm (Hinton and Yutzey, 2011). Cípy chlopní jsou pokryté endotelem a jejich vazivový skelet se skládá ze dvou vrstev: z hustého vaziva – lamina fibrosa, a z vrstvy řídkého vaziva – lamina spongiosa (Lüllmann-Rauch, 2012). Tento skelet obsahuje buňky pojivové tkáně (fibroblasty, fibrocyty) a mezibuněčnou hmotu, především kolagenní a elastická vlákna a proteoglykany (Hopkins, 2005). Kolagen je hlavní složkou mezibuněčné hmoty chlopní a tvoří přibližně 50 % z celkové suché hmotnosti, elastin tvoří 13 % (Bashey et al., 1967). Cípy chlopní jsou pasivními prvky,

kteře se rychle otevírají a zavírají v závislosti na průtoku krve. Kolagenní a elastická vlákna jsou zvlněná, když je tkáň uvolněná a narovnají se již při nízkých silách, což umožňuje velké rozšíření tkáňe při nízkém napětí (Weinberg et al., 2010). Buchananova studie naznačuje, že jednotlivé vrstvy cípů aortální chlopně jsou spojeny příčnými kolagenními vlákny a pracují jako celek (Buchanan and Sacks, 2014).

2.4 Složení viscerálních větví aorty

K viscerálním větvím hrudní aorty patří: průduškové větve, jícnové větve, osrdečnickové větve a mezihrudní větve. Mezi nepárové viscerální větve břišní aorty řadíme: dolní a horní okružní tepnu a břišní kmen, který se větví na slezinnou tepnu, levou žaludeční tepnu a společnou jaterní tepnu. K párovým viscerálním větvím břišní aorty patří: střední nadledvinná tepna, ledvinná tepna, vaječnicková tepna - u žen a arteria testicularis u mužů (Hudák et al., 2015).

Stejně jako u aorty, je i stěna jejích větví členěna na tunica intima, media a adventitia. Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami a tenkou vrstvou řídkého kolagenního vaziva. Lamela elastica interna odděluje tunica intima a media. Hlavní složkou tunica media jsou spirálovitě uspořádané hladké svalové buňky, tvořící přibližně 40 vrstev. Mezi buňkami mohou být cirkulárně orientované elastické lamely, např. v renální tepně. Velké množství základní hmoty tvoří proteoglykany. Tunica adventitia je tvořena longitudinálně a šroubovicově uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny a nachází se zde nemyelinizovaná nervová vlákna autonomního nervového systému (Silver et al., 2001).

2.5 Vybraná nemocnění cévní stěny

2.5.1 Změny cévní stěny související s věkem

Hlavní makroskopické a mikroskopické změny aorty související s věkem jsou excentrické nebo difúzní fibrózní zesílení intimy a fragmentace elastických lamel s rozšiřováním interlamelárního prostoru ohniskovými fibrózními ložisky, což vysvětluje

Teoretický úvod

oslabení vedoucí k dilataci aorty. Dalšími změnami jsou ložiska škrobu a zesílení stěny vasa vasorum (Mills, 2012). Usazování vápníku v tunica media velkých tepen se zvyšuje spolu s věkem a koreluje s jejich tuhostí (Xu and Shi, 2014). Akumulace vápníku v tepnách potkanů byla doprovázena současným zvýšením rychlosti pulzní vlny (Dao et al., 2005). Kalcifikace se velmi často vyskytuje v atheromatózních plátech, může se vyskytovat i v prakticky normální intimě (Mills, 2012). Elastické tepny jsou v axiálním směru výrazně předeprnuté. Tato vlastnost minimalizuje axiální deformace během tlakového cyklu. Změny v biomechanice tepen vyvolané stárnutím se mimo jiné projevují výrazným poklesem předpětí (Horný et al., 2014b), na tom se nejvíce podílí degradace elastinu (Slažanský, 2014).

Cystická mediální degenerace je onemocnění charakteristické fragmentací elastických lamel a úbytkem jejich schopností a ukládáním basofilních hmoty v tunica media velkých tepen. Tyto léze mají tvar cyst. Křehkost aorty může být hlavním důvodem výskytu cystické mediální degenerace. Molekulární nálezy zahrnují apoptické markery a transformující růstový faktor- β (Yuan and Jing, 2011).

Atheroskleróza je charakteristická lézemi v intimě, zvanými atheromatózní pláty, jež vyčnívají do průsvitu cév. Tyto pláty mají žlutý kašovitý střed z lipidů, zejména z cholesterolu, a jsou pokryté bílou fibrózní čepičkou. Mimo to, že způsobují mechanickou obstrukci toku krve, mohou při jejich ruptuře vézt k trombotizaci. Pláty také oslabují spodní medii, čímž vedou ke vzniku výdutě (Da Costa, 1990).

Při diabetu je zvýšená vaskulární syntéza proteinů mezibuněčné hmoty, včetně kolagenu a fibronektinu. Kromě toho, diabetes je spojen s glykací a oxidací proteinů a lipidů, které vedou k tvorbě konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation end products – AGEs), které zahrnují síťování mezibuněčné hmoty. Zesíťování kolagenu s AGEs činí kolageny méně citlivé na degradaci, což podporuje hromadění mezibuněčné hmoty (Martinez-Lemus et al., 2009).

Výduť hrudní aorty je onemocnění, jehož příčina může být vrozená (Marfanův syndrom, syndrom Ehlersův-Danlosův), degenerativní (cystická mediální degenerace), traumatická, zánětlivá nebo mechanická (aortální stenóza, trauma aorty). Zánětlivou příčinou může být např. Takayasuova arteritis, Kawasakiho syndrom či velkobuněčná

Teoretický úvod

arteritida, jež mohou způsobit dilataci kořene aorty, a tím způsobit aortální regurgitaci, která vyžaduje náhradu chlopně. Atherosklerotická léze může penetrovat do aortální stěny a vytvořit výduť, disekci nebo rupturu aorty (Piler and Fila, 2008).

Jeden z mechanismů disekce aorty zahrnuje trhlinu v intimě a patologicky změněnou medii, jež způsobí podélné roztržení medie. Vzniká při něm falešný průsvit a intimální list. Druhý mechanismus spočívá v ruptuře vasa vasorum uvnitř medie, kde vznikne intramurální hematoma, který sekundárně podléhá ruptuře. Příčiny vzniku disekce aorty jsou obdobné jako u vzniku výdutě aorty (Vejvoda et al., 2005).

Nádory elastických cév jsou vzácné onemocnění a rozdělujeme je na primární a sekundární. Primární nádory dále rozlišujeme na nástěnné (v adventitii nebo medii), sarkomy (intraluminální) a smíšené (celá cévní stěna). Sarkomy představují 60 %, nejčastější manifestací je embolie tepen mozku, dolních končetin nebo viscerálních tepen (Krška et al., 2014). Sarkomy jsou odvozené z endotheliálních buněk, buněk intimy nebo z hladkých svalových buněk (Silver et al., 2001). Sekundární nádory jsou častější než primární. Nejčastěji se jedná o nádor plic, jícnu nebo thymu (Krška et al., 2014).

2.5.2 Vybrané vývojové vady

2.5.2.1 Metabolická onemocnění

Marfanův syndrom je způsoben mutací genu kódujícího fibrilin-1, účastníciho se tvorby mikrofibril elastinu, resp. elastických vláken. Ta jsou rozšířena po celém těle. Projevy Marfanova syndromu jsou neobvykle vysoký vzrůst, dlouhé končetiny a prsty a oboustranná dislokace čočky oka z normální polohy (ectopia lentis) (Da Costa, 1990). Ke kardiovaskulárním projevům tohoto onemocnění patří prolaps mitrální chlopně, dilatace aorty a plicnice a disekce aorty (Silver et al., 2001).

Onemocnění zvané osteogenesis imperfecta je autozomálně dominantně dědičná porucha kvality a kvantity kolagenu typu I, při které je nejmenší aminokyselina glycin nahrazena jinými většími aminokyselinami, což způsobuje poruchy ve struktuře trojšroubovice tropokolagenu. Osteogenesis imperfecta se projevuje vadným postavením kloubů, deformacemi a křehkostí kostí a poklesem svalového napětí. Mezi nejčastější

Teoretický úvod

kardiovaskulární projevy patří dilatace kořene aorty, vedoucí k aortální či mitrální regurgitaci (Gautieri et al., 2009).

Příčinou Ehlers-Danlosova syndromu je mutace genu kódujícího syntézu prokolagenu typu III. Nejzávažnější kardiovaskulární komplikace se vyskytují u Ehlersova-Danlosova syndromu typu IV (vaskulární forma). Dochází při něm ke spontánním rupturám velkých a středně velkých tepen. Během těhotenství takto nemocné pacientky může dojít k ruptuře dělohy (Gandalovičová, 2001).

Familiární hypercholesterolemie je genetické onemocnění postihující gen pro kódování LDL-receptoru, který je součástí transportu a metabolismu cholesterolu. Při tomto onemocnění dochází ke ztrátě zpětné kontroly, resp. hladina cholesterolu je stále zvýšená, což indukuje předčasnou atherosklerózu a výrazně zvyšuje riziko infarktu myokardu (Da Costa, 1990).

Další vzácnější onemocnění lze najít ve specializované literatuře (Karlson et al., 1987).

2.5.2.2 Jiná vývojová onemocnění

Koarktace aorty, neboli zúžení aorty, se řadí mezi strukturální anomálie vyskytující se velmi často. Muži touto anomálií trpí dvakrát častěji než ženy. Ačkoliv se koarktace aorty může objevit jako samostatná anomálie, je často spojena s bikuspidální aortální chlopní (50 %), ale také se stenózou aortální chlopně nebo mitrální regurgitací. Při tomto onemocnění dochází k přetěžování srdce a k nedostatečnému prokrvení dolní poloviny těla. Nejčastějším projevem koarktace aorty je hypertenze. Ke zúžení aorty dochází také v místě anastomózy po náhradě části aorty (Da Costa, 1990).

Hypertenze je podle vzniku dělena na esenciální (primární) a sekundární. Esenciální hypertenze tvoří 90-95 % hypertenzí a je způsobena poruchou jednoho nebo více genů. Např. u Liddleho syndromu dochází k abnormalitám sodíkového kanálu v distálním tubulu ledviny. Důsledkem této genetické poruchy je abnormální reabsorpce sodíku s následnou hypokalemií a hypertenzí. Sekundární hypertenze má původ v jiném onemocnění, např.

akutní glomerulonefritidě, renální arteriální stenóze, adrenokortikální hyperfunkci, koarktaci aorty nebo rigiditě aorty (Da Costa, 1990).

Další vývojová onemocnění lze najít ve specializované literatuře (Holmes, 2012; Sadler, 2011) včetně jejich diagnostiky (Žižka, 1994; Hájek et al., 2000).

2.6 Vybraná onemocnění aortální a pulmonální chlopně

Stenóza pulmonální chlopně je relativně častá malformace s mírným až těžkým průběhem. Často je součástí komplexních vrozených srdečních vad. Zúžení pulmonální chlopně vede k tlakovému přetížení pravé komory, následkem toho pravá komora hypertrofuje. Někdy se objevuje poststenotická dilatace plicnice (Da Costa, 1990).

Stenóza aortální chlopně je druhým nejčastějším onemocněním chlopní u dospělých v USA (Rader et al., 2015). Při valvulární aortální stenóze mohou být cípy chlopně hypoplastické (malé), dysplastické (tlusté) nebo jich může být abnormální počet. Závažná vrozená aortální stenóza, kdy dojde k obstrukci výtoku z levé komory, vede k hypoplazii levé komory a vzestupné aorty. Subaortální stenóza je způsobena tlustým prstencem nebo límcem husté fibrózní tkáně pod úrovní pulmonální chlopně (Da Costa, 1990). Subaortální stenóza vede k hypertrofii levé komory (Rader et al., 2015).

Bikuspidální aortální chlopeč je onemocnění s autozomálně dominantní dědičností, postihující 1-2 % populace a může být spojena s abnormalitami stěny aorty jako je koarktace či disekce aorty nebo výduť aorty. Při tomto onemocnění dochází ve větší míře k dilataci kořene aorty než u zdravé populace (Braverman et al., 2005). Dilatace kořene aorty má u nemocných s bikuspidální aortální chlopní progresivní charakter a pokračuje i po náhradě aortální chlopně. S progresí dilatace vzestupné aorty roste i riziko její disekce nebo ruptury. Hlavním podkladem pro dilataci je změněná kvalita stěny aorty a pravděpodobně i mechanické namáhání aortální stěny při asymetrickém a turbulentním toku (Brtko et al., 2011).

Aortální insuficience je onemocnění, při kterém nedostatečný kontakt cípů aortální chlopně vede ke zpětnému toku krve z aorty zpět do srdce. Může mít příčinu ve vlastní aortální chlopní nebo může být způsobena dilatací kořene aorty nebo dilatací vazivového

prstence, ve kterém jsou cípy chlopně ukotveny. Aortální insuficience může vzniknout náhle, např. při infekční endokarditidě, nebo se vyvíjet delší dobu, např. při hypertenzi (Da Costa, 1990).

Další onemocnění aortálních a pulmonálních chlopní lze najít ve specializované literatuře (Silver et al., 2001).

2.7 Histologická analýza elastických tepen

Při charakterizaci biologických materiálů lze s výhodou kombinovat testy mechanické, biochemické a histologické. Každá z těchto technik má své nezastupitelné místo. Biochemická analýza může poskytnout přesné hodnoty zastoupení jednotlivých složek v materiálu, ale během homogenizace je ztracena informace o vzájemném rozmístění těchto složek. Histologie poskytuje informace o morfologické stránce, architektonice tkáně, tvorbě mezibuněčné hmoty, vaskularizaci, zánětlivé reakci a také informaci o kvantitativním zastoupení jednotlivých složek ve tkáni. K tomu, aby prohlížení řezů tkání poskytlo požadovanou odpověď, je třeba zvolit správný postup zpracování vzorků (zalití preparátu, barvení tkáňových řezů). Nejběžnější metodou, jak měkkou tkáň připravit na krájení tenkých řezů, je zalití chemicky fixované tkáně do parafínového bločku. Využívá se při tom parafín o teplotě 56°C. Alternativně lze obejít parafínový proces zmražením na cca – 25°C a pořídit řezy na zmrazovacím mikrotomu (Kubíková et al., 2015).

Části buněk a orgánů na sebe vážou různá barviva, díky tomu jsme pak schopni v mikroskopu odlišit jednotlivé buňky a tkáně při vhodně zvolené metodice barvení. Ke specifickému průkazu antigenů proteinové povahy využíváme jeho reakce s protilátkou. Tabulka 1 a 2 shrnují přehledné barvicí metody a běžně využívané metody afinitní histochemie využitelné v histologii pro hodnocení složení orgánů (Kubíková et al., 2015).

Tabulka 1. Přehledné barvení s příklady použití.

barvení a citace jeho aplikace	průkaz složek cévní stěny
hematoxylin-eosin (Aguirre-Sanceledonio et al., 2003; Leeuwenburgh et al., 2003; Tonar et al., 2015a,b)	vazivo, svalovina, buněčná jádra
orcein (Tonar et al., 2015a; Kubíková et al., 2017a; Táborský et al., 2017)	elastin
pikrosiriová červeň (Flues et al., 2012; Tonar et al., 2015a; Kubíková et al., 2017a)	kolagen typu I a III (v polarizačním světle rozlišíme oba typy)
Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (Kocová, 1970; Tonar et al., 2016; Kubíková et al., 2017a; Táborský et al., 2017)	elastin, kolagen, svalovina
von Kossa (Gauthier-Bastien et al., 2014; Kubíková et al., 2017a)	kalcifikace
alcian blue + PAS (Periodic Acid Schiff) (Tanios et al., 2015; Mattson et al., 2017)	kyselé a neutrální glykosaminoglykany (GAG), glykogen, proteoglykany

Tabulka 2. Imunohistochemické metody s příklady použití.

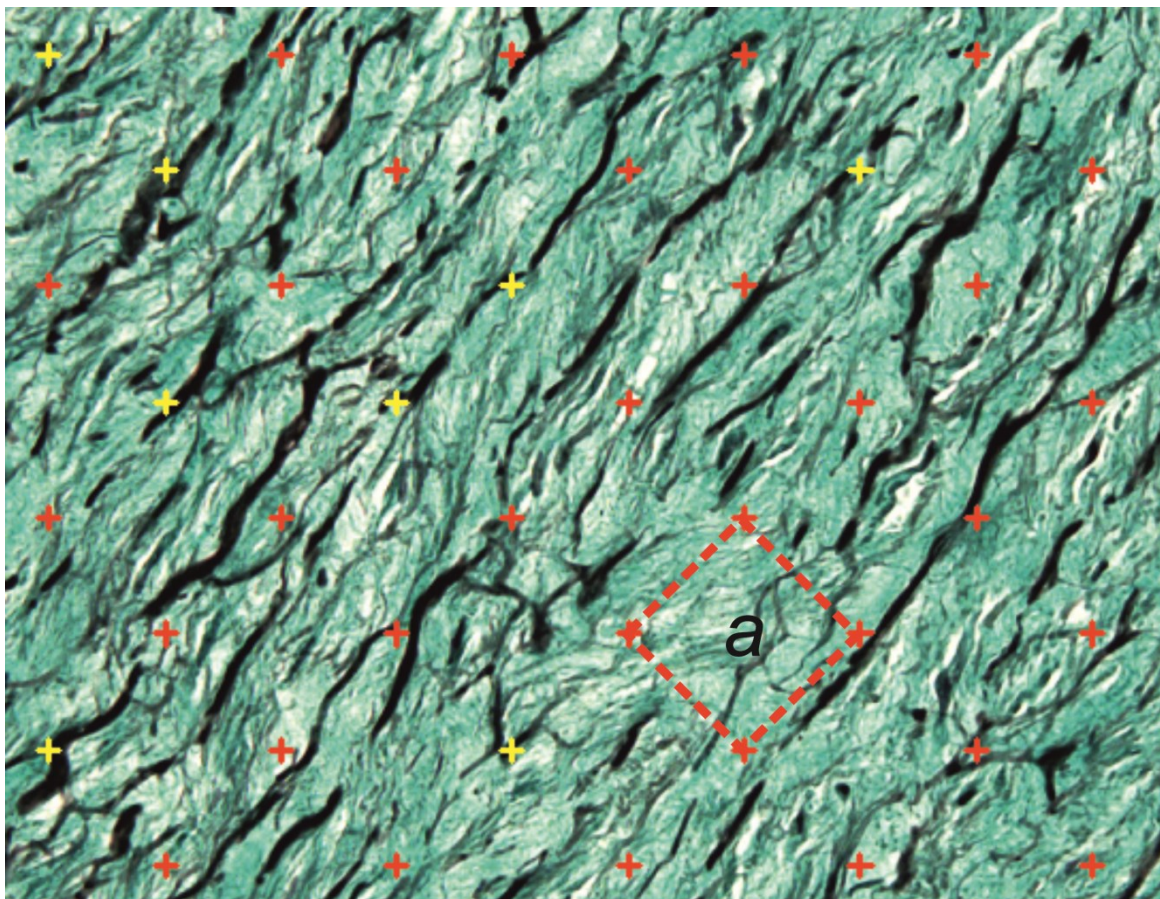
protilátky a citace jejich aplikace	průkaz složek cévní stěny
proti- α -hladkosvalovému aktinu (Nedorost et al., 2013; Tonar et al., 2015a; Kubikova et al., 2017)	hladké svalové buňky (marker kontraktilního fenotypu)
proti-desminu (Tonar et al., 2015a)	hladké svalové buňky (marker kontraktilního fenotypu)
proti-vimentinu (Tonar et al., 2015a)	hladké svalové buňky (marker syntetického fenotypu) a další buňky mezenchymového původu
proti-chondroitinsulfátu (Kubíková et al., 2017b)	chondroitinsulfát (glykosaminoglykan)
proti-von Willebrandovu faktoru (Tonar et al., 2012, 2016; Táborský et al., 2017)	endoteliální buňky
proti-neurofilamentovému proteinu (Nedorost et al., 2013; Táborský et al., 2017)	periferní nervy

Úkolem histologa při hodnocení složení orgánů není pouze vybrat správnou metodu barvení, která mu pomůže jednotlivé typy tkání od sebe odlišit, ale také techniku hodnocení. Jednou z možností jsou skórovací systémy, v nichž jsou vyšetřované parametry (např. buněčná morfolgie, pravidelnost povrchu, strukturální integrita, tloušťka, přítomnost degenerativních změn aj.) (Kubíková et al., 2015) klasifikovány pomocí semikvantitativní bodovací škály (Táborský et al., 2017). Výhodou tohoto postupu je relativní robustnost škál a tudíž možnost pracovat s heterogenním materiálem a zhodnotit řadu vlastností do celkové pozice na stupnici, jejímž jednotlivým parametrům může být přiřazována různá váha dle jejich biologické důležitosti. Na druhou stranu se do výsledků značně promítají zkušenosti hodnotitele, což může negativně ovlivnit reprodukovatelnost výsledků. Skórovací systém je robustní metoda, tzn., že i při malé změně parametrů poskytuje metoda pořád správné a přesné výsledky. Robustnost skórovacích systémů se může projevit i jako jejich slabina, protože nadprůměrně dobré skóre v některých

Teoretický úvod

parametrech může být kompenzováno podprůměrnými výsledky v parametrech jiných a v celkovém pořadí mohou skončit vzorky s naprosto odlišným biologickým chováním blízko sebe (Kubíková et al., 2015). Odlišnou strategií je proto kvantifikace složení tkáně pomocí jednotlivých spojitých proměnných, které popisují např. počet buněk v jednotkovém objemu, délky cév či vláknitých struktur mezibuněčné hmoty, plochy povrchů, plošné a objemové podíly složek tkáně, shlukování a kolokalizaci mikroskopických objektů. V současnosti je pro výzkumné účely k dispozici řada technik analýzy obrazu, která většinou vychází z automatické či poloautomatické segmentace obrazu pomocí prahování v barevných prostorech, event. může kombinovat více kritérií pro automatické odlišení tkáňových komponent (např. kritéria založená na analýze kontrastu a tvarových charakteristikách). Automatizované metody obrazové analýzy jsou schopny zpracovat velké objemy dat, vyžadují však vysokou homogenitu vstupních obrazových dat. Ta nebývá i přes pečlivou laboratorní práci v histologii vždy dosažitelná a spolu s přítomností artefaktů (prachové částičky, precipitáty barviva, mikrotrhliny ve vzorcích) zvyšuje riziko jak chyby 1. druhu (nahodnocení výsledků kvůli falešné pozitivitě), tak chyby 2. druhu (podhodnocení kvůli falešné negativitě) (Kubíková et al., 2015). Proto v řadě aplikací kvantitativní mikroskopie dominují postupy stereologie, s jejíž pomocí můžeme získat informace o trojrozměrném objektu z měření provedených na dvourozměrných rovinných řezech (Mouton, 2002; Kochová et al., 2013). Na rozdíl od prahovacích postupů využívaných v analýze obrazu je stereologický přístup založen na efektivním využití stochastické geometrie, kdy jednotlivé charakteristiky vzorku jsou statisticky vypočítávány z interakce hodnocených preparátů s geometricky definovanými testovacími mřížkami, obr. 2. Započítaných událostí (průsečíků) musí být dostatečný počet, obvykle více než 150 (Gundersen and Jensen, 1987), přičemž o každém z nich se hodnotitel rozhoduje nezávisle na ostatních. Vedle vlastního hodnocení mikroskopických objektů je nezbytně nutné zachovat na všech úrovních, kdy dochází k redukci materiálu, nevyčýlenou strategii vzorkování. Typickým příkladem je systematický náhodný sběr tkáňových bločků pro histologii z celého orgánu, dále výběr histologických řezů k hodnocení a výběr mikroskopických zorných polí při zvětšení potřebném pro jednoznačnou identifikaci mikrostruktur (Kubíková et al., 2015). Zachování strategie systematického nestranného náhodného výběru (Mouton, 2002) vede pak k významné

redukci variability kvantitativních dat. Rovněž je kvantifikována vzorkovací chyba, nejčastěji pomocí koeficientu chyby (CE - coefficient of error), ať už na úrovni rozdílů mezi sousedními řezy či zornými poli v mikroskopu. Příklady interpretace takto získaných kvantitativních parametrů jednotlivých tkáňových komponent podává tabulka 3. Vztahy mezi hodnotou kvantitativního parametru a jeho interpretací nemají mnohdy charakter přímé závislosti nebo přímé lineární závislosti.



Obr 2. Bodová testovací mřížka pro odhad plošného podílu elastických vláken ve stěně aorty.

Mikrofotografie znázorňuje černá elastická vlákna a zelená kolagenní vlákna v tunica media aorty. Bodová testovací mřížka (červené křížky) je přiložena na mikrofotografii a žluté křížky znázorňují interakci elastických vláken spolu s testovací mřížkou o známých rozměrech, danými mřížkovou konstantou a , což je plocha příslušející jednomu testovacímu bodu.

Tabulka 3. Parametry kvantitativní analýzy vzorků a interpretace jejich biologického významu.

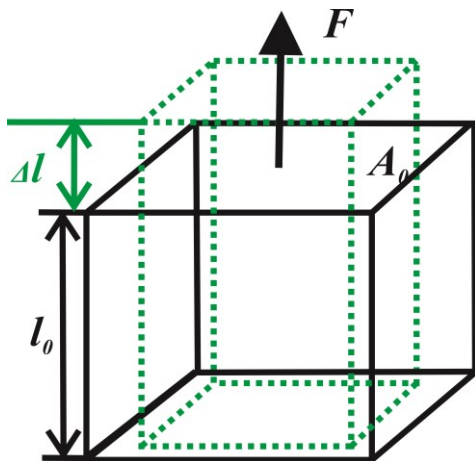
tkáňová komponenta	možné biologická interpretace	kvantitativní parametr (rozměr veličiny)
kolagen I	vysoký podíl zralých vláken kolagenu typu I přispívá k mechanické odolnosti tkáně, ale také ke zvýšení tuhosti tkáně (Tanios et al., 2015)	plošný podíl ve tkáni (-)
elastin	vysoký podíl vláken elastinu přispívá k pružnosti tkáně (Fung, 1993; Holzapfel and Ogden, 2006)	plošný podíl ve tkáni (-)
kalcifikace	vysoký podíl kalcifikace přispívá ke zvýšení tuhosti stěny cév (Gauthier-Bastien et al., 2014)	plošný podíl ve tkáni (-)
vimentin	vysoký podíl syntetických hladkých svalových buněk přispívá k větší tvorbě složek mezibuněčné hmoty, což může vést ke zvýšení tuhosti tkáně a k rozvoji atherosklerózy (Lorentzen et al., 2016)	plošný podíl ve tkáni (-)
von Willebrandův faktor	vysoká hustota vasa vasorum koreluje s tloušťkou stěny aorty a s plošným podílem elastinu v aortě (Tonar et al., 2016)	plošná mikrovazální hustota (mm^{-2}) numerická hustota mikrocév (mm^{-3}) délková hustota (mm^{-2})
neutrofilní granulocyty; lymfocyty; makrofágy	vysoký počet zánětlivých buněk se podílí na imunitní odpovědi organismu, např. při aortitidě (Saddoughi et al., 2017)	plošný podíl ve tkáni (-) numerická hustota buněk (mm^{-3})
proteoglykany	nízké množství proteoglykanů může vést k destabilizaci výdutě aorty a zvýšit riziko jejího prasknutí (Tanios et al., 2015)	plošný podíl ve tkáni (-)

Numerická a délková hustota jsou trojrozměrné parametry, k jejichž stanovení jsou nutné silné řezy vzorkem nebo série přesně registrovaných řezů fyzických, což je možné u tkání,

kteří jdou dobře krájet (např. centrální nervový systém, svalovina). Naproti tomu u vzorků fragilních či vzorků heterogenního složení (např. vysoce porézní vzorky, bločky s kombinací měkkých a tvrdých tkání) nelze obvykle silné řezy získat bez deformací, trhlin a jiných artefaktů znemožňujících trojrozměrné hodnocení. Za silný řez v tomto významu považujeme takový, jehož tloušťka je násobkem maximálního rozměru stanovované struktury ve směru kolmém na rovinu řezu, tj. např. trojrozměrné hodnocení mikrocév o průměru 7-10 μm vyžaduje řezy o tloušťce cca 20 μm . Cévní segment je definován jako úsek mezi dvěma uzlovými body cévního stromu (Løkkegaard et al., 2001).

2.8 Mechanické testování elastických tepen

Nejčastější mechanický test je jednoosá zkouška tahem, obr. 3. Materiál je zatěžován postupně měnící se silou v jednom zvoleném směru. Zatížení vede k prodloužení neboli deformaci ve směru zatížení, které působí kolmo k průřezu vzorku.

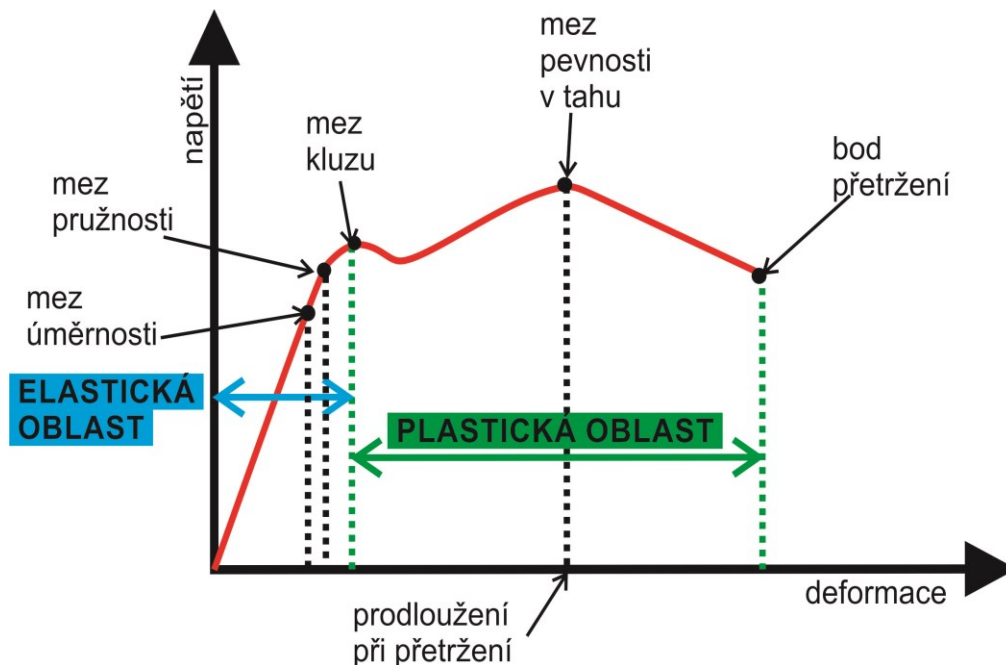


Obr. 3. Schéma zatěžování materiálu při jednoosé zkoušce tahem (Kubikova et al., 2016).

F je síla zatížení, A_0 je počáteční plocha materiálu na příčném průřezu, l_0 je počáteční délka materiálu, Δl je skutečná deformace (prodloužení).

Tahovým zkouškám lze podrobit jak proužky vyříznuté z cévní stěny (Sokolis, 2007) tak kroužky cév (Venkatasubramanian et al., 2006, 2010). Výsledkem takového měření je křivka napětí-deformace (obr. 4), kde na ose x je vyneseno aplikované napětí a na ose y deformace (prodloužení) materiálu. Deformační křivka charakterizuje mez kluzu,

pevnost v tahu, modul pružnosti, protažení, a houževnatost materiálu (Kubikova et al., 2016).



Obr. 4. Příklad obecné křivky napětí-deformace s kritickými body (Kubikova et al., 2016).

Tvar křivky napětí-deformace se liší mezi materiály. U většiny materiálů se objevuje prvotní lineární závislost mezi napětím a deformací, zatímco sklon (gradient) této počáteční křivky napětí-deformace, charakterizuje modul pružnosti nebo také Youngův modul pružnosti (E). Vysoký modul pružnosti koresponduje s větší tuhostí materiálu, to znamená, že je zapotřebí většího napětí pro vytvoření dané deformace. Lineární vztah se řídí Hookovým zákonem, vyjádřeným rovnicí:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1)$$

kde σ je normálové napětí [Pa], ε je relativní prodloužení (deformace) [-], E je Youngův modul pružnosti [Pa]. V uzavřeném cyklu deformace a napětí se setkáváme se ztrátami energie, neboli s hysterezí. Je-li napětí odstraněno během této fáze deformace, materiál se vrátí do svých původních rozměrů. Tento proces je opakovatelný, reverzibilní a nazývá se elastická deformace. Mez úměrnosti (proportionality limit) na křivce napětí-deformace, je hodnota napětí, po které se deformace materiálu již mění nelineárně podle aplikovaného napětí. Cévy vykazují viskoelastické vlastnosti jako plastové polymery, které procházejí

s rostoucím napětím druhým stupněm deformace, nazvaným plastická deformace (obr 3). Sklon křivky napětí-deformace se změní v plastické fázi: významné zvýšení deformace je spojena s malým nebo žádným zvýšením napětí. Bod změny se nazývá mez kluzu. Je-li materiál uvolněn po zatížení překračující mez kluzu, nevrátí se do svých původních rozměrů, a trvalá plastická deformace zůstává (Kubikova et al., 2016).

I když jsou jednoosé tahové zkoušky výhodné pro stanovení vlastností selhání tkáně, nemusí být nejvhodnější metodikou pro posouzení anizotropie tkáně. Dvouosé zkoušky mohou být použity k určení, zda se vlastnosti tkáně liší v axiálním směru nebo po obvodu. Další výhodou je, že takové vyšetřování se provádí u jednoho vzorku. Kdybychom obdobné výsledky chtěli získat z jednoosých testů, museli bychom užít dva sousední vzorky a zatěžovat je v navzájem kolmém směru (Avanzini et al., 2014). Při měření ve dvou osách jsou strany většinou kvadratického vzorku uspořádány v souladu se dvěma směry zatížení. Napětí se obvykle aplikuje pomocí háčků, svorek nebo pomocí chirurgického šití zakotveného na každé straně. Deformace se vypočítá na základě video-sledování posunu značek umístěných ve střední oblasti vzorku (Avanzini et al., 2014).

Podíl jednotlivých složek stěny cév na mechaniku celé cévy nebo jejích vrstev lze sledovat po jejich enzymatickém odstranění a sledováním změny mechanických parametrů (Beenakker et al., 2012; Kochová et al., 2012). Trávení pomocí elastázy odhalilo podkladovou kolagenovou strukturu v tunica media a snížilo tuhost tunica media podle očekávání, protože elastin je jednou z jejích hlavních složek. Síťová struktura a mechanika adventitie zůstala po odstranění elastinu nezměněna. Trávení kolagenázou oslabilo obě vrstvy – tunica media i adventitia. Oslabení tunica adventitia (45násobný pokles tuhosti) bylo silnější než v tunica media (3násobný pokles) (Beenakker et al., 2012).

2.9 Aorta jako model v tkáňovém inženýrství

Některé výše popsané degenerativní změny postihující velké elastické tepny, jako je atheroskleróza, můžeme pozorovat také u středních a malých cév. Při některých život ohrožujících změnách cévní stěny je třeba cévu nahradit nebo udělat její bypass, aby bylo zajištěno dostatečné zásobení oblasti, kterou céva vyživovala. Cílem tkáňového inženýrství

Teoretický úvod

je vyrobit takovou cévní náhradu nebo bypass, který by byl mechanicky pevný a odolával krevnímu tlaku, sloužil jako lešení pro buňky hostitele a vytvořil vhodné podmínky pro jejich růst a šíření. Zároveň musí být kompatibilní, neimunogenní a netoxický. Povrchová smáčivost náhrad podporuje adhezi buněk a způsobuje odolnost náhrady vůči tvorbě trombů. Taková lešení (scaffoldy) jsou vyráběny především z rozložitelných polymerů, které postupem času degradují a jsou nahrazeny vlastními vlákny a dalšími složkami mezibuněčné hmoty příjemce. Pro výrobu scaffoldů je používána např. polyglykolová kyselina (PGA), polylaktidová kyselina (PLA), polykaprolaktanová kyselina (PCL) nebo jejich kopolymery. Syntetické cévní náhrady s velkým průměrem jsou již v současné době používány v klinické praxi. Avšak náhrady s malým průměrem pod 6 mm jsou stále ve stádiu vývoje. Největším rizikem maloprůměrových cévních náhrad a bypassů je jejich brzká neprůchodnost po implantaci (Horáková, 2015). Modifikace cévních náhrad látkami uvolňujícími oxid dusnatý (NO) zlepšuje biokompatibilitu cévních náhrad, podněcuje šíření a růst endotelových buněk, na druhou stranu tlumí růst, šíření a produkci hladkých svalových buněk. Oxid dusnatý také snižuje chemotaxi (pohyb, vyvolaný změnami chemického složení prostředí) leukocytů a jejich vybuzení (Ahanchi et al., 2007).

Mimo velká modelová zvířata jako je ovce (Valencia Rivero et al., 2017) nebo prase (Leitão et al., 2016; Valencia Rivero et al., 2017) se využívají k testování maloprůměrových náhrad také myši aorty (Kurobe et al., 2015; Tara et al., 2015).

Histologické metody využívané k popisu stavby cévní stěny a kvantifikaci jejich složek lze stejně dobře využít k *in vivo* hodnocení cévních náhrad. Lze sledovat případnou zánětlivou odpověď organismu na materiál, hustotu osídlení buňkami, tloušťku cévní stěny, tvorbu složek mezibuněčné hmoty a kvantifikovat je nebo případně kvalitativně popsat jiné nálezy. Mechanické vlastnosti cévních náhrad by se měli co nejvíc podobat těm, které má céva, jež má být nahrazena, za fyziologických okolností. Při *in vivo* experimentech se však projevilo, že rozložitelné polymery mají často nedostatečné mechanické vlastnosti, které mohou vést k vytvoření výdutě (Pařízek, 2012). K základnímu testování jejich vlastností lze využít jednoosé tahové zkoušky (Laterreur et al., 2014).

3 Cíle a hypotézy

Při řešení základní otázky mikroskopického složení a mechanických vlastností aorty a plicnice vyvstalo mnoho otázek, proto jsem si vytyčila níže popsané dílčí cíle a postupně je řešila. Pro experimentální chirurgii a biomechaniku elastických tepen je často jako model používána prasečí aorta (Saari et al., 2012; Suk et al., 2012; Eberlová et al., 2013, Houdek et al., 2013), proto jsem studovala otázku rozdílu histologického složení prasečí aorty v závislosti na lokalizaci a věku. A následně jsem řešila hypotézu korelace lokálního složení aorty s orientací hladkých svalových buněk v její stěně. Poté jsem studovala korelaci mechanických vlastností s histologickým složením kryoprezervovaných lidských alograftů aortálních a pulmonálních chlopní a aort a plicnic a také vliv elastických lamel na šíření experimentálně navozených trhlin u kryoprezervovaných vzorků aort a plicnic. Dále jsem sledovala akutní poškození renální tepny a přilehlých nervových pletení po radiofrekvenční ablacii. V neposlední řadě jsem porovnávala dva typy malopřůměrových cévních náhrad při *in vivo* experimentu na myši břišní aortě.

K ověření těchto hypotéz jsem definovala následující cíle:

1. Kvantifikovat zastoupení elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu v různých proximodistálních segmentech aorty odlišných věkových skupin prasete jakožto modelu pro experimentální chirurgii a biomechaniku elastických tepen.
2. Zjistit, zda orientace hladkosvalových buněk v tunica media aorty prasete statisticky koreluje s lokálním složením tepenné stěny.
3. Zjistit, do jaké míry spolu statisticky koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alograftů aorty a plicnice s jejich mechanickými vlastnostmi.
4. Zjistit, do jaké míry spolu koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alograftů aortální a pulmonální chlopně s jejich mechanickými vlastnostmi.
5. Zjistit, jakou úlohu hraje systém elastických lamel při šíření experimentálně navozené trhliny v kryoprezervovaných alograftech aorty a plicnice.

Cíle a hypotézy

6. Zjistit rozsah poškození renální tepny ovce na histologické úrovni při experimentální renální denervaci a posoudit účinnost dvou typů katetrů používaných k radiofrekvenční ablacii.
7. Zjistit rozdíl v osídlení a stavbě dvou typů cévních náhrad po jejich implantaci místo myší břišní aorty po deseti dnech a šesti měsících.

3.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří

Prasečí aorta se používá například při modelování změn aorty během hypertenze (Hu et al., 2008), po vagotomii (Sokolis et al., 2005), po hrudní sympatektomii (Angouras et al., 2012) a jako model výdutě břišní aorty (abdominal aortic aneurysm – AAA) (Eberlová et al., 2013; Houdek et al., 2013). Prasečí model výdutě břišní aorty se užívá pro zavedení mezenchymálních kmenových buněk do poraněné aorty (Turnbull et al., 2011), pro simulaci opravy ruptury výdutě břišní aorty (Suk et al., 2012), pro testování technik endovaskulárních zákroků (Lederman et al., 2014) a pro testování stentů (Saari et al., 2012).

Histologické a biomechanické rozdíly mezi segmenty aorty byly sledovány Sokolisem (Sokolis, 2007; Sokolis et al., 2008), který prokázal převládající elastin nad kolagenem v proximálních segmentech aorty stejně jako převládající kolagen nad elastinem v distálních segmentech. Kim (Kim and Baek, 2011; Kim et al., 2013) se zabýval biomechanickými odlišnostmi obvodových a podélných segmentů aorty, přičemž našel největší moduly pružnosti v posterior distálních segmentech. Nicméně systematické histologické a histopatologické studie, zahrnující celou aortu, jako v případě Sokolise (Sokolis et al., 2008), jsou vzácné, zvláště u prasečích aort. Důvodem naší studie bylo přispět k rozšíření vědomostí o segmentálních rozdílech a s věkem souvisejících rozdílech v prasečí aortě.

Formulovali jsme proto následující otázku:

Jaké je zastoupení elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu v různých proximodistálních segmentech aorty prasete a v různých věkových skupinách?

3.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete

Počítačové modely stěny aorty předpokládají, že hladké svalové buňky a kolagenní vlákna jsou uspořádány jako dvě téměř symetrické šroubovice (Holzapfel, 2006). Tento rozumný předpoklad byl nedávno potvrzen ve většině segmentů prasečí aorty (Tonar et al., 2015b). Objemové podíly elastinu, kolagenu a hladkých svalových buněk v definovaných úsecích tunica media aorty, které jsme získali v předchozí studii (Tonar et al., 2015a), jsme chtěli porovnat s orientací hladkých svalových buněk v těchto segmentech.

Formulovali jsme proto následující otázku:

Koreluje orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete s lokálním složením tepenné stěny?

3.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Lidské kryoprezervované alografty pulmonálních a aortálních chlopní, stejně jako kořeny těchto velkých elastických tepen, jsou rutinně používány jako náhrady kořene aorty, plicnice a chlopní u vybrané skupiny pacientů. Tato operace je nezbytná zejména při valvulární aortální stenóze (Rader et al., 2015; Huygens et al., 2016), ale alografty srdečních chlopní se používají také při jiných aortálních a pulmonálních chlopenní patologiích, kdy chirurgická oprava není možná. Spolu s chirurgickou technikou, jsou dostatečné biomechanické vlastnosti a zachovaná histologická struktura štěpů považovány za nezbytné pro řádný výsledek rekonstrukční chirurgie (Arabkhani et al., 2015). Doba použitelnosti kryoprezervovaných alografů byla libovolně stanovena na pět let ve většině tkáňových bank ve světě. Nicméně kryoprezervace může vést ke změnám těchto náhrad. K hodnocení kvality štěpů můžeme použít histologickou a mechanickou analýzu. Dosud není známo, jak koreluje histologická stavba s mechanickými vlastnostmi kryokonzervovaných lidských aortálních a pulmonálních chlopní a kořenů velkých elastických tepen.

Formulovali jsme proto následující otázku:

Do jaké míry spolu koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alogenních štěpů aorty a plicnice s jejich mechanickými vlastnostmi?

3.4 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně

Mikrostruktura a mechanické vlastnosti aortálních a pulmonálních chlopní byly pozorovány Stradinsem (Stradins, 2004), ale podobné výsledky pro kryogenně uchovávané aortální a pulmonální chlopně zatím neexistují. Doba použitelnosti alogenních štěpů těchto chlopní je stejná, jako u štěpů aort a plicnic.

Formulovali jsme proto následující otázku:

Do jaké míry spolu koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alogenních štěpů aortální a pulmonální chlopně s jejich mechanickými vlastnostmi?

3.5 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici

Elastická vlákna jsou považována za odolný prvek mezibuněčné hmoty cévní stěny (Xu and Shi, 2014). Není však známo, zda elastické lamely plní tuto úlohu i po kryoprezervaci. Proto jsme studovali šíření experimentálně navozených trhlin přes stěnu kryoprezervovaných alograftů aort a plicnic.

Formulovali jsme proto následující otázku:

Jakou úlohu hraje systém elastických lamel při šíření experimentálně navozené trhliny v kryoprezervovaných alograftech aorty a plicnice?

3.6 Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablaci autonomních nervů

Zvýšená aktivita sympatického nervového systému je jedním z rozhodujících faktorů při rozvoji a udržování hypertenze (Monhart, 2013). U pacientů s tzv. rezistentní hypertenzí, kteří nereagují na standardní antihypertenzní terapií (Rippy et al., 2011), může být použita k léčbě hypertenze denervace renální tepny. Ačkoli tato metoda byla v posledních pěti letech velmi rozšířená a u vybraných pacientů vedla účinně ke snížení krevního tlaku (Mahfoud et al., 2013; Bhatt et al., 2014), dosud nejsou k dispozici uspokojivé údaje

Cíle a hypotézy

o bezpečnosti a účinnosti této metody. Důkazy z preklinických experimentálních studií, týkající se bezpečnosti a účinnosti různých systémů pro radiofrekvenční denervaci renální tepny, jsou omezené a prozatím poskytly pouze nepřesvědčivé údaje týkající se účinnosti denervací. Jednobodový katetr (Symplicity Flex od společnosti Medtronic) byl široce využíván ve studiích na prasatech, ovcích i lidech (Rippy et al., 2011; Mahfoud et al., 2013; Bhatt et al., 2014; Booth et al., 2015; Sakakura et al., 2015). Inovativní vícebodový ablační katetr pracuje ve více vrstvách renální tepny současně (Worthley et al., 2013; Henegar et al., 2014; Mahfoud et al., 2016). Přilehlý nervový svazek má být tedy více ovlivněn aplikovanou radiofrekvenční energií. Na druhé straně může být vážně poškozena renální tepna. Dosud nebyly poskytnuty žádné údaje pro porovnání morfologických účinků jednobodového a vícebodového katetru v akutní fázi, proto jsme tyto dva systémy sledovaly a histologicky porovnali poškození renální tepny po její katetrizační denervaci (Táborský et al., 2017).

Formulovali jsme proto následující otázku:

Jaký je rozsah poškození stěny viscerálních větví aorty ovce na histologické úrovni při experimentální renální denervaci a jaká je účinnost dvou typů katetrů používaných k radiofrekvenční ablaci?

3.7 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

Syntetické cévní náhrady s velkým průměrem jsou již úspěšně používány v klinické praxi. K náhradě cév s průměrem menším než 6 milimetrů jsou stále první volbou biologické štěpy. Jejich kvalita a délka nemusí být vždy dostatečná. Tkáňové inženýrství se v současné době zaměřuje na výrobu právě maloprůměrových cévních náhrad, které prozatím v klinické praxi chybí (Horáková, 2015).

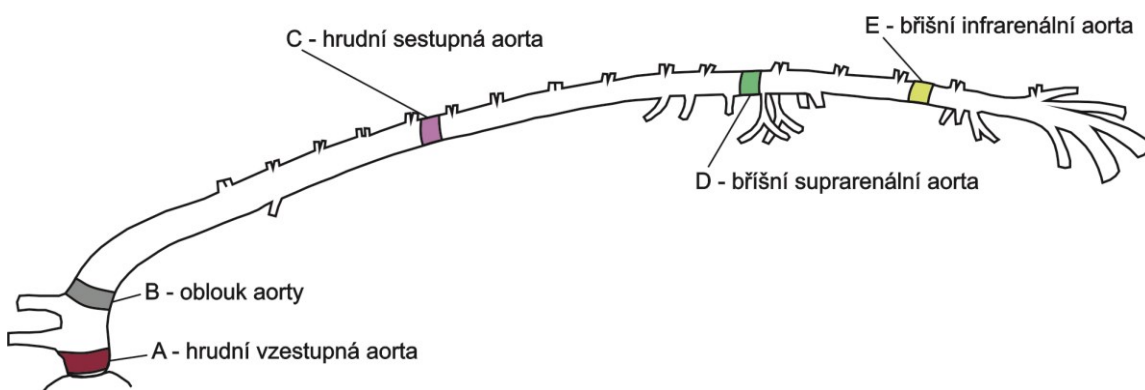
Formulovali jsme proto následující otázku:

Existuje rozdíl v osídlení buňkami a ve složení dvou typů cévních náhrad po jejich implantaci místo myší břišní aorty po deseti dnech a šesti měsících?

4 Materiály a metody

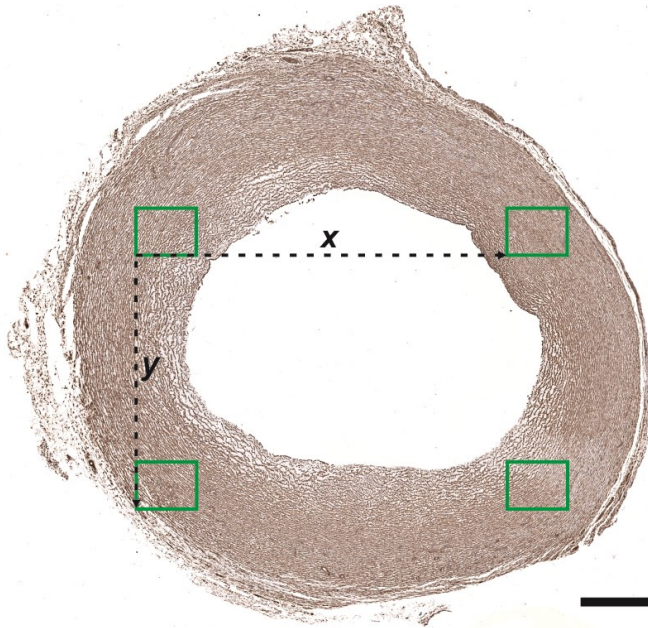
4.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří

Jedinci byli rozděleni do tří skupin podle věku: 0-28 dní (selata); 29-75 dní (odstavená selata) a 180-230 dní (výkrmová prasata). Pro analýzu bylo použito 25 celých aort prasat, které byly po chemické fixaci formaldehydem rozděleny na 5 segmentů: hrudní vzestupná aorta, oblouk aorty, hrudní sestupná aorta, břišní aorta suparenální a infrarenální, obr. 5.



Obr. 5. Vzorkování prasečí aorty (Tonar et al., 2015a).

Z každého segmentu byl vytvořen parafinový tkáňový bloček, který byl krájen kolmo na podélnou osu cévy na řezy o síle 4 μm . Z každého bločku bylo odkrojeno šest řezů, které byly barveny kombinací Verhoeffova hematoxylinu se zeleným trichromem, pikrosiriovou červení, orceinem a imunohistochemicky pomocí protilátky anti- α -smooth muscle actin (Clone 1A4, Dako, Glostrup, Denmark), anti-vimentin (Clone V9, Dako, Glostrup, Denmark) a anti-desmin (Clone D33, Dako, Glostrup, Denmark). Z každého řezu byly nasnímány a hodnoceny 4 fotografie, při zachování náhodného výběru, obr. 6. Byly hodnoceny tyto parametry: tloušťka intima-media, celá tloušťka stěny, plošný podíl kolagenu, elastinu, α -hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu. Ke stereologickému odhadu plošných podílů byla využita bodovací testovací mřížka v programu Elipse (VIDITO, Košice, Slovenská Republika).



Obr. 6. Výběr zorných polí pro odhad plošných podílů jednotlivých složek stěny aorty (Tonar et al., 2015a).

Stěna aorty prasete; barveno imunohistochemicky protilátkou proti- α -hladkosvalovému aktinu; měřítko 500 μm .

4.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete

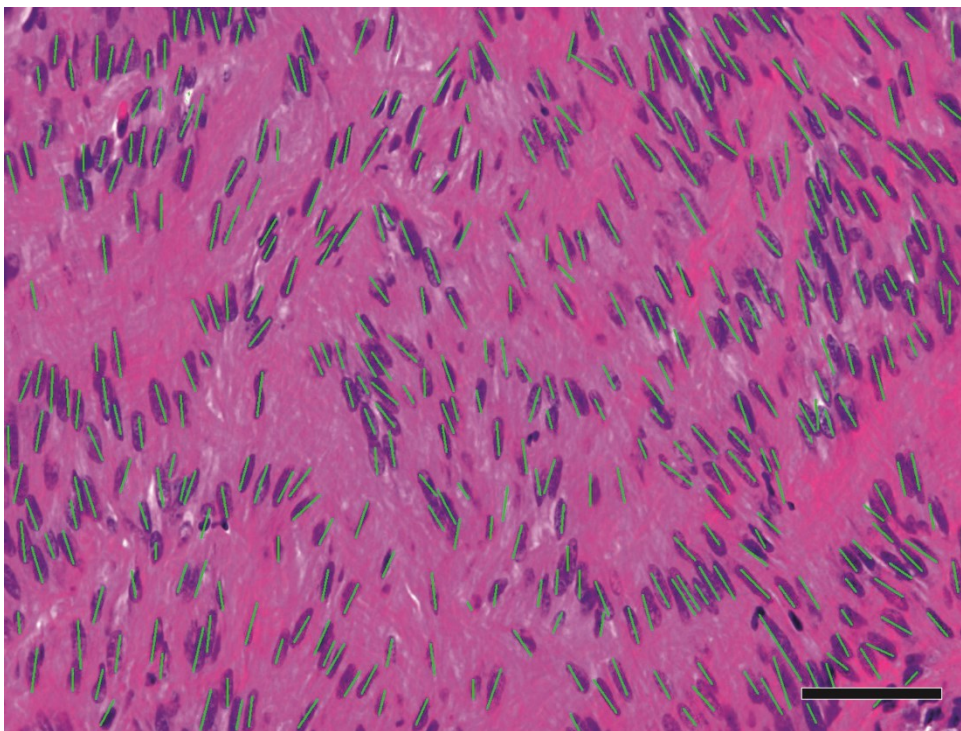
Pro analýzu bylo použito 17 prasečích aort, rozdělených na 5 segmentů podle schématu na obr. 5. Řezná rovina byla tangenciální k aortě. Řezy z vytvořených tkáňových bločků byly barveny hematoxylinem-eosinem. Orientaci hladkých svalových buněk jsme sledovali s využitím orientace jejich jader. Směr každého jádra hladké svalové buňky na fotografiích tangenciálních řezů aorty byl označen pomocí orientované čáry rovnoběžné s dlouhou osou jádra, obr. 7. Histogramy distribuce byly získány za použití dvou von Misesových rozdělení charakterizovaných parametry: μ míra umístění a κ míra koncentrace (převrácená hodnota rozptylu). Pokud $\kappa = 0$, distribuce je uniformní. Jestliže je hodnota κ velká, distribuce je soustředěná kolem úhlu μ (Tonar et al., 2017), viz rovnice 2.

$$f(x|\mu, \kappa) = \frac{e^{\kappa \cdot \cos(x-\mu)}}{2\pi I_0(\kappa)}, \quad (2)$$

kde $I_0(\kappa)$ je modifikovaná Besselova funkce prvního druhu s $p = 0$. Parametr μ ukazuje polohu, kolem které je distribuce seskupena a je analogická střední hodnotě normálního rozdělení; κ ukazuje koncentraci distribuce (Gao et al., 2006). Větší hodnoty κ reprezentují

Materiály a metody

orientace populace hladkých svalových buněk více soustředěných kolem jejich úhlu μ , zatímco nižší hodnoty κ reprezentují více rozptýlenou orientaci hladkých svalových buněk (Tonar et al., 2017). Použili jsme předpoklad (Holzapfel, 2006) existence centrálního úhlu symetrie, který rozděluje populace hladkých svalových buněk na dva hlavní směry (šroubovice), z nichž každý je charakterizován vlastním parametrem μ_1 a μ_2 . Střední úhel mezi oběma směry charakterizuje blízkost mezi oběma předpokládanými symetrickými šroubovicemi hladkých svalových buněk. Metodiku sledování orientace hladkých svalových buněk v prasečí aortě podrobně popsal Tonar (Tonar et al., 2015b). Centrální úhel symetrie oddělující dvě šroubovice hladkých svalů do dvou hlavních směrů jsme statisticky porovnali s informacemi o složení stěny aorty z předchozí studie, jako byl objemový podíl elastinu, kolagenu, α -hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu a také s hodnotou tloušťky intima-media.



Obr. 7. Směr hladkých svalových buněk (Tonar et al., 2017).

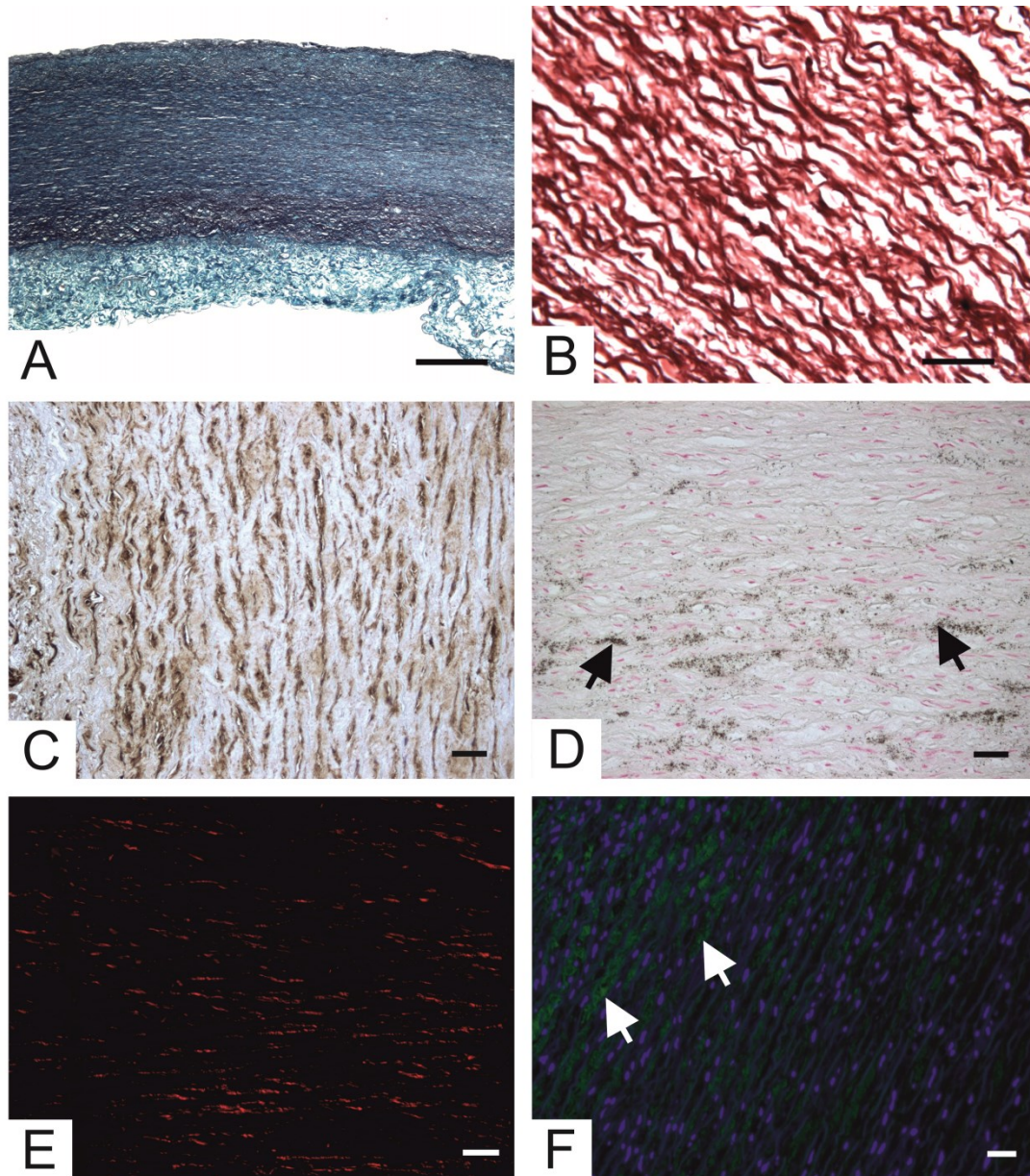
Směr každého jádra hladké svalové buňky fotografovaného v tangenciálních řezech prasečí aortou byl označen pomocí orientované čáry rovnoběžné s dlouhou osou jádra. Barveno hematoxylin-eosin, měřítko 50 μm

4.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Ke studii bylo použito 12 aortálních a 8 pulmonálních kryoprezervovaných alograftů chlopní, které byly odebrány, zpracovány a skladovány při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Oddělení transplantací a tkáňové banky FN Motol podle etablovaného protokolu (Spatenka et al., 1997). Z každého alograftu byl po rozmražení vyříznut prstenec kořene aorty nebo plicnice, který byl následně mechanicky testován v laboratoři centra excelence NTIS Fakulty aplikovaných věd ZČU. K analýze pasivních mechanických vlastností těchto vzorků byl použit jednoosý tahový test prstenců tepen. Získali jsme hodnoty následujících parametrů: Youngův modul pružnosti v oblasti malých a velkých deformací, mez pevnosti a mezní deformaci. Poté byly vzorky chemicky fixovány a doručeny na Ústav histologie a embryologie LF v Plzni, kde byly odvodněny a zality do parafinových bločků kolmo ke své dlouhé ose. Parafinové bločky byly krájeny na řezy o síle $5\text{ }\mu\text{m}$ a barveny. Použité barvicí techniky (obr. 8) a sledované histologické parametry jsou shrnuty v tabulce 4. U parametrů z mechanické a histologické analýzy jsme sledovali jejich vzájemnou statistickou korelaci.

Tabulka 4. Vzorkování mikrofotografií pro měření histologických parametrů (Kubíková et al., 2017a, 2017b).

hodnocený parametr	barvení	počet fotografií na vzorek	použitý objektiv
tloušťka celé stěny (WT)	Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom	4	4x
tloušťka intima-media (IMT)			
plošný podíl kolagenu ve stěně - A_A(collagen, wall)	pikrosiriová červeň	8	20x
plošný podíl elastinu v intima- media - A_A(elastin, media)	orcein	8	40x
plošný podíl kalcifikace ve stěně - A_A(Ca, wall)	von Kossa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)	8	20x
plošný podíl hladkosvalového aktinu ve stěně - A_A(SMC, wall)	protilátka anti- α -smooth muscle actin (Clone 1A4, Dako, Glostrup, Denmark)	8	20x
plošný podíl chondroitinsulfátu ve stěně - A_A(CS, wall)	protilátka anti-chondroitin sulfate (Clone CS-56, Sigma Aldrich, Missouri, USA)	8	20x

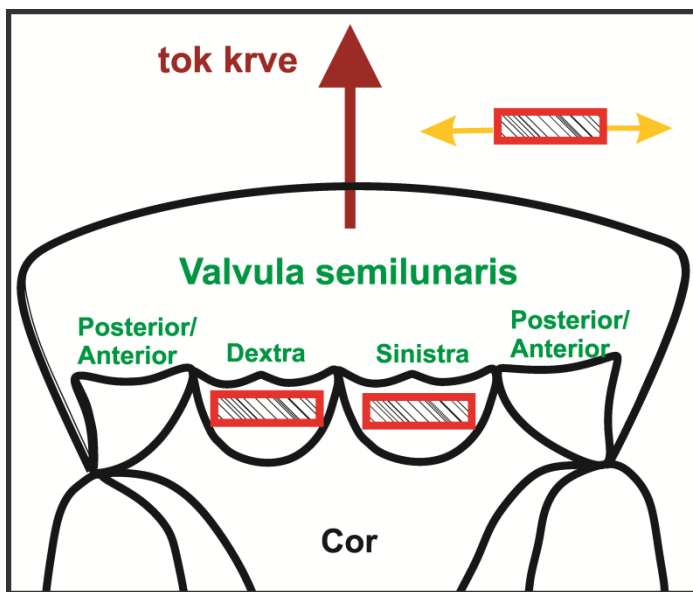


Obr. 8. Histologické barvicí metody použité při analýze složení kořene aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a, 2017b).

A – Zelená kolagenní vlákna a černá elastická vlákna ve stěně aorty; barveno Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem. B – Hnědo-červená elastická vlákna v tunica media; barveno orceinem. C – Hnědé hladké svalové buňky v tunica media aorty; barveno imunohistochemicky za použití protilátky anti- α -smooth muscle actin. D – Černá ložiska mikrokalifikace (černé šipky) ve stěně aorty; barveno technikou von Kossa. E – Červená kolagenní vlákna typu I v tunica media plicnice v polarizačním světle; barveno pikrosiriovou červení. F – Zelený chondroitinsulfát (bílé šipky) ve stěně aorty; barveno imunohistochemicky protilátkou anti-chondroitin sulfát a dobarvení jader pomocí DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride). Měřítko 500 μ m (A), 100 μ m (B, E) a 50 μ m (C, D, F).

4.4 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně

Z kryoprezervovaných alograftů aortální a pulmonální chlopně (12 aortálních a 8 pulmonálních chlopní), které byly použity v předchozí studii, jsme po rozmražení rovněž odebrali vždy dva proužky cípů chlopní podle schématu na obrázku 9. Mechanická analýza vzorků probíhala taktéž v laboratoři centra NTIS Fakulty aplikovaných věd ZČU. Proužky tkání byly podrobeny jednoosé tahové zkoušce, ze které jsme získali následující parametry: Youngův modul pružnosti v oblasti malých a velkých deformací, mez pevnosti a mez deformace.



Obr. 9. Schéma odběru vzorků z cípů aortální/pulmonální chlopně a směr jejich zatěžování při mechanické analýze (Kubíková et al., 2017).

Z cípů srdečních chlopní byly vyříznuty vždy dva vzorky z každé chlopně podle schématu, valvula semilunaris dextra a sinistra (červené obdelníky). Směr zatěžování při analýze mechanických vlastností je naznačen žlutými šipkami.

Po mechanickém měření byly vzorky chemicky fixovány a doručeny na Ústav histologie a embryologie LF v Plzni, kde byly, odvodněny a zality do parafinových bločků kolmo ke své dlouhé ose. Parafinové bločky byly krájeny na řezy o síle 5 μm a barveny. Použité barvicí techniky a sledované histologické parametry jsou shrnuty v tabulce 5. Mezi parametry z mechanické a histologické analýzy jsme hledali statistickou korelaci.

Tabulka 5. Vzorkování mikrofotografií pro měření histologických parametrů cípů aortální a pulmonální chlopně (Kubíková et al., 2017a, 2017b).

hodnocený parametr	barvení	počet fotografií na vzorek	použitý objektiv
tloušťka celé stěny (WT)	Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom	4	4x
plošný podíl kolagenu ve stěně - A_A(collagen, wall)	pikrosiriová červeň v polarizačním světle	8	20x
plošný podíl elastinu ve stěně - A_A(elastin, wall)	orcein	8	40x
plošný podíl chondroitinsulfátu ve stěně - A_A(CS, wall)	protilátka anti- chondroitin sulfátu (Clone CS-56, Sigma Aldrich, Missouri, USA)	8	40x

4.5 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici

Pro studium mikrotrhlin bylo použito deset kryoprezervovaných kořenů aorty a deset plicnic po mechanickém zatížení. Pro histologickou analýzu mikrotrhlin vyvolaných experimentální mechanickou analýzou byla použita již dříve zavedená metoda (Tonar et al., 2009). Abychom určili vztah mikrotrhlin a elastických vláken, porovnali jsme odhadovanou hodnotu hustoty průsečíků elastických vláken podél trhliny P'_L s jeho teoretickou hodnotou P_L vypočítanou za předpokladu nezávislosti trhlin na elastických vlákních. Hustota průsečíků elastických vláken v mikrotrhlinách byla definována následovně:

$$P_L = \frac{p}{l} \quad (3)$$

kde p je počet průsečíků podél trhliny o délce l .

Hustota průsečíků profilů trhlin s elastickými vlákny P'_L byla spočtena dělením skutečného počtu těchto průsečíků (p') počítaných v úsecích maximální projekční délkou

profilů (l). Maximální délku projekce trhliny jsme použili jako spodní hranici skutečné délky. Maximální projekční délku trhliny (l) jsme odhadli jako nejkratší vzdálenost mezi počátkem a koncem profilu trhliny.

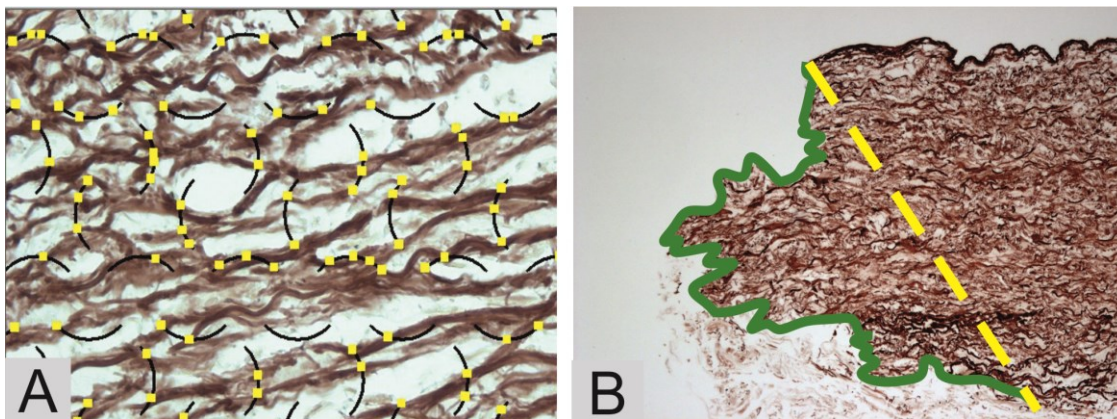
Teoretická hustota průsečíků byla za předpokladu nezávislosti trhlin a elastických vláken vypočtena jako hustota průsečíků náhodně orientované linie (tj. profilu trhliny) s elastickými vlákny (Stoyan et al., 1995) podle rovnice:

$$P_L = \frac{2}{\pi} \cdot L_A \quad (4)$$

kde L_A byla 2D hustota elastických vláken v tunica media. Pro každou elastickou tepnu jsme stanovili délkovou hustotu L_A elastických vláken následovně:

$$L_A = \frac{L}{A} \quad (5)$$

kde L_A je délková hustota, L je délka elastických vláken a A je oblast referenčního prostoru tunica media. Délka (L) byla odhadnuta počítáním průsečíků mezi elastickými vlákny a kruhovými oblouky umístěnými náhodně na mikrofotografie (obr. 10). Pro odhad parametrů L a A jsme použili modul LineSystem v programu Ellipse (VIDITO, Košice, Slovensko) (Mouton, 2002; Tonar et al., 2009; Kubíková et al., 2017a).



Obr. 10. Studium vztahu mezi mikrotrhlinami a elastickými vlákny (Kubíková et al., 2017a).

A - Kruhové obloučky, které jsou v kontaktu s elastickými vlákny, byly použity pro stanovení dvojrozměrné délkové hustoty elastických vláken L_A . B - Okraj trhliny je zvýrazněn zeleně. Maximální délka projekce l je nakreslena jako žlutá čára. Červeno-hnědá elastická vlákna byla obarvena orceinem.

4.6 Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů

K hodnocení účinků dvou katetrů, jednobodového - Symplicity Flex™, Medtronic a vícebodového EnligHTN™, užitých k denervaci nervové pleteně doprovázející renální tepnu, bylo použito 12 ovcí. Experiment probíhal v Centru experimentální medicíny IKEM. Vždy byla denervována jedna renální tepna. Ovce byly zařazeny do dvou skupin smíšeného pohlaví podle použitého systému denervace, každá skupina obsahovala šest zvířat. Z každé ovce byla odebrána renální tepna, která byla denervována a pro porovnání také renální tepna, která nebyla ovlivněna. Každá tepna byla rozdělena na osm až devět úseků po 3 mm. Tyto vzorky byly chemicky fixovány a dále zpracovány na Ústavu histologie a embryologie. Z každého vzorku byly připraveny parafínové tkáňové bločky, které byly krájeny a na vzniklé řezy byly použity čtyři barvicí metody: hematoxylin-eosin; Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom; Malloryho trichrom a orcein. Dále byly použity imunohistochemické metody za použití protilátek anti- α -smooth muscle actin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), anti-neurofilament protein (DakoCytomation), anti-von Willebrand factor (DakoCytomation), anti-tyrosine hydroxylase (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Táborský et al., 2017).

Klasifikace hodnocení histologických změn po 48 hodinách po denervaci renální tepny je uvedena v tabulce 6. Byly posuzovány vždy 4 kvadranty cévní stěny na řezu. Způsob vyhodnocení získaných hodnot pro každý studovaný vzorek je uveden v tabulce 7. Typické příklady poranění renální tepny jsou ilustrovány na obrázku 11 a poranění sympatických nervových vláken je uvedeno na obrázku 12. Bodový systém odráží buď závažnost (nebo stupeň) poškození stěny tepen a přilehlých nervových vláken a relativní rozsah těchto změn.

Byly použity neparametrické statistické analýzy: Wilcoxonův párový test byl použit pro porovnání výsledků zjištěných v denervovaných tepnách a v neovlivněných tepnách stejného zvířete. Mann-Whitneyův U-test byl použit k vyhodnocení rozdílů mezi dvěma různými typy katetru. Korelace mezi parametry histologické analýzy byly vyhodnoceny užitím Spearmanova korelačního koeficientu (Táborský et al., 2017).

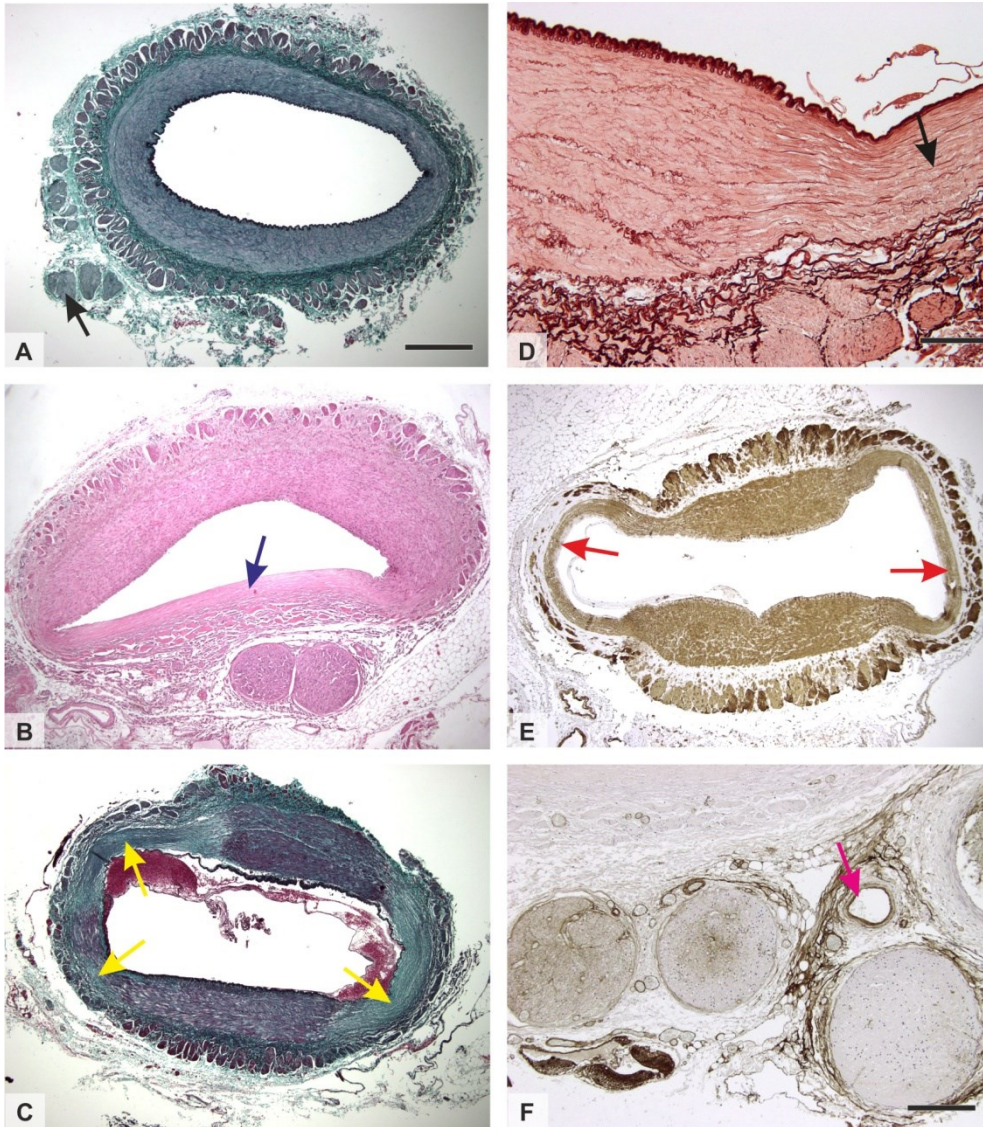
Tabulka 6. Semikvantitativní stupnice pro hodnocení poškození renální tepny a přilehlých nervových pletení v příčně orientovaných řezech segmentů tepny (Táborský et al., 2017).

Body (1-4) byly přiděleny každému kvadrantu tepny a ukazují poranění tepny nebo nervových vláken ve studovaném segmentu, viz obrázky 11-12 ilustrující typické histologické nálezy.

	body pro každý segment tepny	zjištěné histologické poškození renální tepny
hodnocení poškození renální tepny po její denervaci	0	nebylo pozorováno žádné poškození
	1,2,3,4	excentrické poškození a zeslabení stěny tepny
	1,2,3,4	denaturace kolagenu
	1,2,3,4	poškození elastických membrán
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na α -hladkosvalový aktin
	1,2,3,4	poškození vasa vasorum
	1	přítomnost intraluminálních trombů
	body pro každý segment nervů	zjištěné histologické poškození nervů obklopující renální tepnu
hodnocení poškození periferních nervových pletení doprovázející renální tepnu po její denervaci	0	nebylo pozorováno žádné poškození
	1,2,3,4	hyperémie nervových pletení
	1,2,3,4	destruktivní fragmentace nebo kompletní ztráta Schwannových buněk
	1,2,3,4	poškození vnitřních struktur nervu: ztráta nervové pochvy a struktury endoneuriální pojivové tkáně
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na neurofilamentový protein
	1,2,3,4	ztráta imunopozitivity na tyrosin hydroxylázu

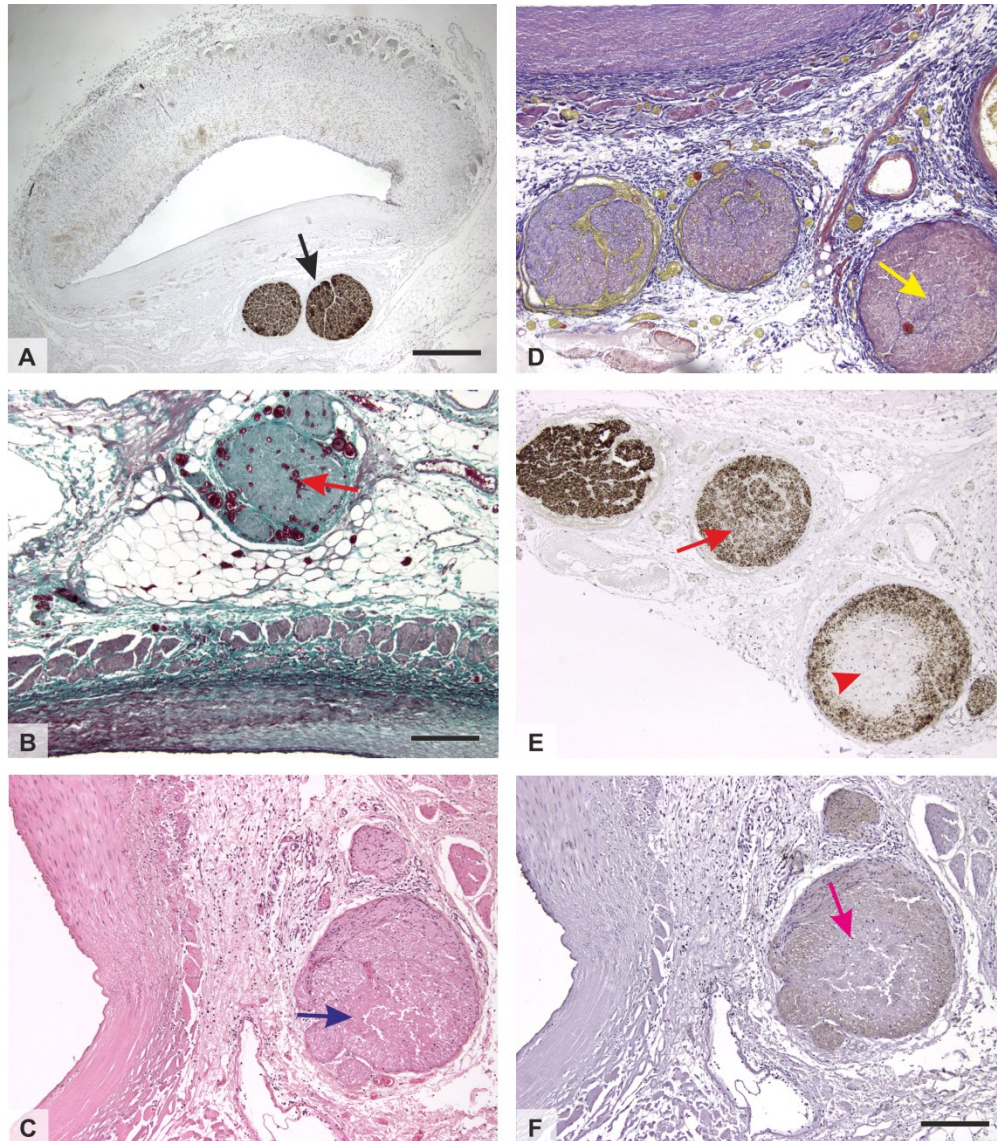
Tabulka 7. Způsob vyhodnocení získaných hodnot ze skórovacího systému (Táborský et al., 2017).

parametr	definice
součet bodů vaskulárního poškození a součet bodů nervového poškození na jedince	vypočítáno součtem bodů ze všech 3 mm dlouhých segmentů renální tepny (typicky 8 segmentů); toto bylo provedeno pro cévní poškození a poškození nervů zvlášť
maximální vaskulární poškození a maximální poškození nervů	maximální hodnota zjištěná u studovaných segmentů u daného zvířete a orgánu
průměrný počet bodů vaskulárního nebo nervového poškození na segment	aritmetická střední hodnota skórovacích výsledků na segment, vypočtená dělením součtu skóre vaskulárního poškození nebo součtu skóre poranění nervu počtem segmentů tepny v daném jedinci a orgánu



Obr. 11. Histologické posouzení poškození renální tepny po indukované denervaci renální tepny v příčných histologických řezech, uspořádané podle semikvantitativní stupnice (Táborský et al., 2017).

A - Žádné histologické známky poranění tepen nebo nervů (černá šipka). B - Excentrické ohniskové poškození a oslabení stěny (modrá šipka). C - Denaturace kolagenu ve třech kvadrantech (žluté šipky). Je viditelný také intraluminální trombus. D - Poškozené elastické membrány ve vrstvě tunica media (černá šipka). E - Ztráta imunopozitivity proti α -hladkosvalovému aktinu ve dvou kvadrantech (červené šipky). F - Zvětšené nebo zničené vasa vasorum v adventitii tepny (purpurová šipka) v blízkosti nervů. Barvení Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (A, C), barvení hematoxylin-eosinem (B), barvení orceinem (D, hnědá), imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu v hladkých svalových buňkách cév (E, tmavě hnědá pozitivita), imunohistochemická detekce von-Willebrandova faktoru v endotelových buňkách (F, tmavě hnědá pozitivita). Měřítko 500 μ m (A-C, E), 100 μ m (D) a 200 μ m (F).



Obr. 12. Histologické hodnocení poškození nervů doprovázejících renální tepnu v příčných histologických řezech, uspořádané podle semikvantitativní stupnice (Táborský et al., 2017).

A - Žádné histologické známky poškození nervů (černá šipka). B - Hyperémie nervu s dilatovanými vasa nervorum (červená šipka). C - Destruktivní fragmentace a úplná ztráta jádra gliových Schwannových buněk (modrá šipka). D - Ztráta jemné struktury endoneuriové pojivové tkáně mezi nervovými vlákny (žlutá šipka). E - Střední ztráta (červená šipka) nebo úplná ztráta (červená špička šipky) imunopozitivity na neurofilamentový protein. F - Ztráta imunopozitivity na tyrosin hydroxylázu (purpurová šipka). Imunohistochemická detekce neurofilamentového proteinu (A, E, tmavě hnědá pozitivita). Barvení Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem (B), barvení hematoxylin-eosinem (C), barvení Malloryho trichromem (D), imunohistochemická detekce tyrosin hydroxylázy (F, tmavě hnědá pozitivita). Měřítko 500 μm (A) a 200 μm (B-F).

4.7 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

Hodnoceny byly dva typy cévních náhrad: jeden z čistého polykaprolaktanu a druhý z polykaprolaktanu, který navíc uvolňoval oxid dusnatý. Od každého typu náhrady bylo použito sedm kusů. Byly implantovány na místo myší břišní aorty. Po deseti dnech byly odebrány od každého typu náhrady tři vzorky, po šesti měsících zbývající čtyři. Vzorky byly fixovány mrazem a pomocí mrazícího média (Neg 50, Thermo Scientific) a krájeny na histologické řezy o síle 10 μm s rovinou řezu rovnoběžnou s dlouhou osou aorty. Tyto řezy byly pořízeny na Technické univerzitě v Liberci a následně doručeny na Ústav histologie a embryologie LF v Plzni. Zde byly barveny pěti histologickými metodami: hematoxylinem-eosinem, Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem, orceinem, pikrosiriovou červení a kombinací barvení alcianové modři a PAS (Periodic Acid Schiff). Dále byly barveny osmi imunohistochemickými metodami, pomocí protilátek: anti- α -smooth muscle actin (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), anti-CD34 (Abcam, Cambridge, USA) (průkaz endotelových buněk), anti-CD31 (DakoCytomation) (průkaz endotelových buněk), anti-von Willebrand factor (DakoCytomation) (průkaz endotelových buněk), anti-neurofilament protein (DakoCytomation), anti-CD68 (DakoCytomation) (průkaz makrofágů), anti-MAC 387 (Thermo Scientific™ Lab Vision, Pittsburgh, Pennsylvania) (průkaz makrofágů), anti-iNOS (Abcam) (průkaz endogenní produkce oxidu dusnatého). Metody barvení byly vybrány tak, aby charakterizovaly buněčnou populaci štěpů způsobem podobným jiným výzkumným pracím v oboru (de Valence et al., 2012; Hwang et al., 2008; Mrówczyński et al., 2014; Tillman et al., 2009; Zheng et al., 2012). Vzhledem k tomu, že hodnocení bylo zaměřeno na úseky v blízkosti střední roviny, byl počet úseků vybraných pro studii omezen. Každá ze třinácti metod barvení byla použita na 2 řezy, celkově tedy bylo vyhodnoceno 26 řezů na náhradu, celkem 364 řezů na celou studii. Kvantitativní parametry, které byly hodnoceny v programu Elipse (VIDITO, Košice, Slovenská Republika), jsou shrnuty v tabulce 8. Ostatní identifikační znaky tkáňových složek, které se vyskytovaly nekonzistentně nebo ve velmi malých množstvích a nebyly vhodné pro reprezentativní vzorkování a kvantifikaci, byly hodnoceny kvalitativně.

Tabulka 8. Kvantitativní parametry použité pro studii morfologie stěny vaskulárních štěpů.

zkratka kvantitativního parametru	definice, referenční prostor, interpretace a jednotky	použité vzorkování a objektiv
Q_A – vnitřní vrstva	počet (nebo dvourozměrná – 2D hustota) profilů jader buněk nalezených uvnitř nejvnitřnější třetiny tloušťky štěpu na podélném řezu (mm^{-2})	
Q_A – střední vrstva	počet (nebo 2D hustota) profilů jader buněk nalezených uvnitř střední třetiny tloušťky štěpu na podélném řezu (mm^{-2})	
Q_A – vnější vrstva	počet (nebo 2D hustota) profilů jader buněk nalezených uvnitř vnější třetiny tloušťky štěpu na podélném řezu (mm^{-2})	2 snímky
Q_A – průměr na náhradu	průměrný počet (nebo 2D hustota) profilů jader buněk nalezených uvnitř celého štěpu na podélném řezu (mm^{-2})	z centrální části štěpu;
f(náhrada)	relativní průměrná vzdálenost profilů jader od vnějšího okraje štěpu nalezených uvnitř štěpu; bezrozměrný parametr v rozmezí 0-1, kde 0 značí profily jader přímo na vnějším okraji štěpu a 1 značí jádra na vnitřní hranici (luminální neointimy) (-)	objektiv 10x
tloušťka náhrady	tloušťka štěpu měřená jako střední vzdálenost mezi adluminálním (neointimálním) povrchem profilu a vnějším abluminálním (vnějším) okrajem (μm)	
A_A(elastin, náhrada)	plošný podíl elastických vláken barvených orceinem na průřezu štěpem (-)	2 snímky z celého štěpu; objektiv 10x
A_A(kolagen, náhrada)	plošný podíl kolagenu typu I a III barvených pikrosiriovou červení a pozorovaných v polarizačním světle na průřezu štěpem (-)	2 snímky z celého štěpu; objektiv 10x
A_A(SMA, náhrada)	plošný podíl α -hladkosvalového aktinu v cytoplazmě buněk (myofibroblasty a hladké svalové buňky) na průřezu štěpem (-)	4 snímky z celého štěpu; objektiv 20x

Materiály a metody

Distribuce hodnot neměla normální rozložení a tak jsme k porovnání dat použili neparametrickou statistiku. Korelace mezi kvantitativními proměnnými byly vyhodnoceny pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Vzhledem k tomu, že počet vzorků podle typu štěpu a délky implantace byl příliš nízký, aby bylo možno provádět simultánní seskupení podle délky implantace a typu štěpu, byly obě tyto nezávislé proměnné použity pro samostatné seskupení během statistického vyhodnocení. Mann-Whitney U-test byl použit k vyhodnocení rozdílů mezi skupinami podle doby implantace (pro tento účel byly seskupeny typy štěpů), stejně jako pro testování rozdílů mezi těmito dvěma druhy štěpů (pro tento účel byly sloučeny skupiny podle doby implantace). Fairmanova ANOVA a Wilcoxon párový test byly použity pro porovnání infiltrace štěpů buňkami v odpovídajících štěpech. Všechny testy byly prováděny v programu Statistica Base 11 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Výsledky testu byly považovány za statisticky významné pro $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří

5.1.1 Segmentální rozdíly ve složení tunica media

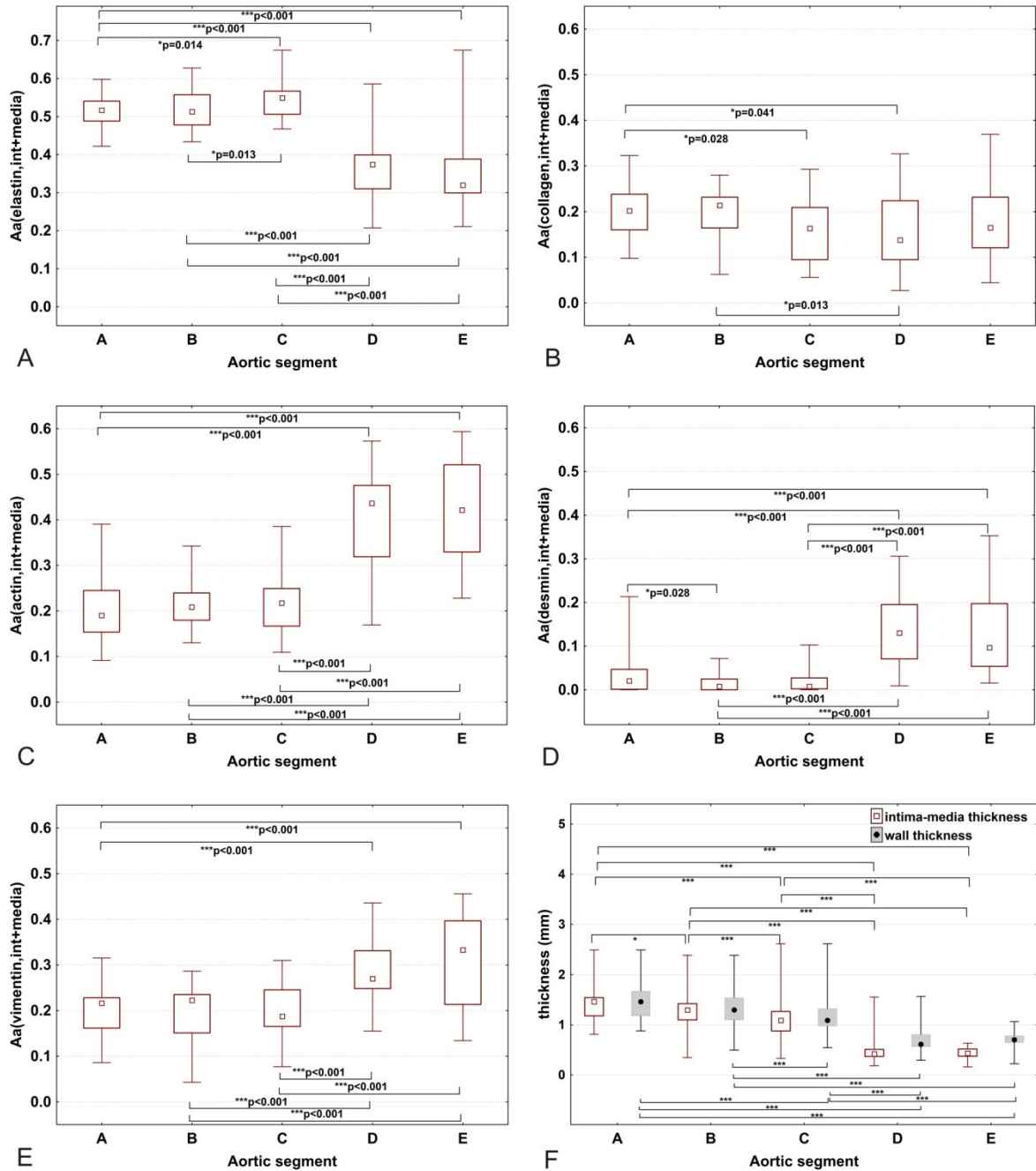
Bylo zjištěno několik rozdílů při porovnávání hodnot ve všech proximodistálních segmentech aorty stejných jedinců. Výsledky jsou zobrazeny a statistiky shrnuty na obrázku 13. Plošný podíl elastinu (obr. 13A) vykazoval velmi významné rozdíly mezi téměř všemi segmenty aorty, po něm následoval aktin (obr. 13C), desmin (obr. 13D) a vimentin (obr. 13E). Největší podíl elastinu byl nalezen v hrudní sestupné aortě, po ní následoval oblouk aorty, hrudní vzestupná aorta, břišní aorta suprarenální a nakonec břišní aorta infrarenální. Plošný podíl kolagenu (obr. 13B) vykazoval proximodistální pokles pouze při srovnání hrudní aorty vzestupné se sestupnou a břišní aortou suprarenální stejně tak při porovnání oblouku aorty s břišní aortou suprarenální (Tonar et al., 2015a).

Největší podíl aktinu (obr. 13C), desminu (obr. 13D) a vimentinu (obr. 13E) byl pozorován v obou částech břišní aorty, po nich následovala sestupná hrudní aorta, oblouk aorty a hrudní aorta vzestupná. Vzestupná hrudní aorta se nelišila od oblouku aorty v žádném z parametrů, s výjimkou nižšího plošného podílu desminu. Při porovnání břišní suprarenální aorty s infrarenální nebyly zjištěny žádné rozdíly (Tonar et al., 2015a).

5.1.2 Rozdíly ve složení tunica media mezi věkovými skupinami

Kvantitativní výsledky zobrazující věkové rozdíly ve složení aortální stěny jsou shrnuty na obr. 14. Plošný podíl elastinu v tunica media byl nižší u výkrmových prasat než u odstavených selat. Plošný podíl kolagenu byl u výkrmových prasat vyšší než u selat. Plošný podíl aktinu v tunica media byl ve všech věkových skupinách srovnatelný. Plošný podíl desminu byl nižší u selat než u odstavených selat a výkrmových prasat. Plošný podíl vimentinu postupně klesal s věkem: byl vyšší u selat než u odstavených selat a výkrmových prasat a byl vyšší u odstavených selat než u výkrmových prasat (Tonar et al., 2015a).

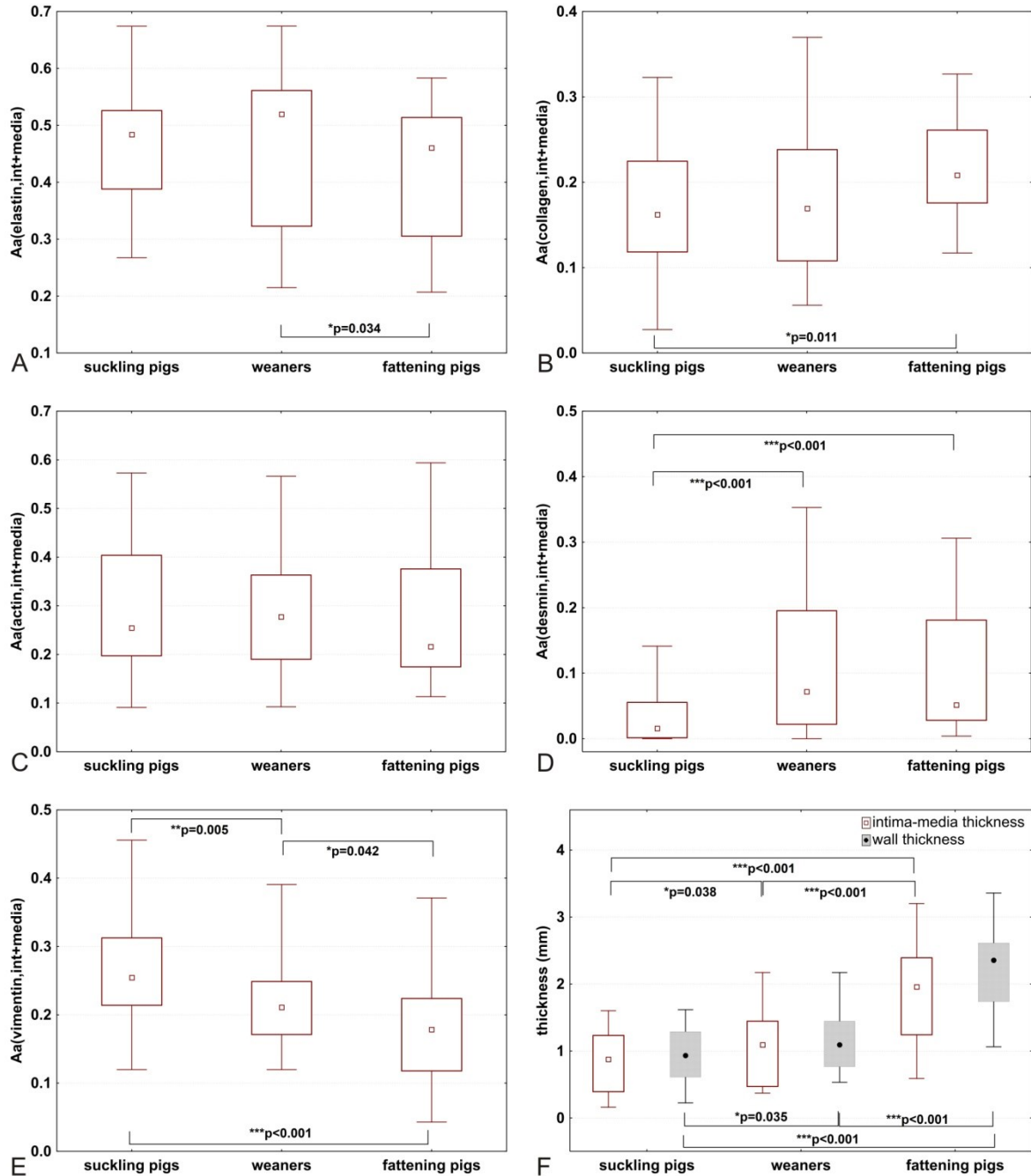
Výsledky



Obr. 13. Plošný podíl (A_A) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tloušťka stěny v pěti aortálních proximodistálních segmentech (Tonar et al., 2015a).

A, B, C, D a E označují hrudní vzestupnou aortu, oblouk aorty, hrudní aortu sestupnou, břišní aortu suparenální a břišní aortu infrarenální. Věkové skupiny byly pro toto srovnání sloučeny. Byly testovány pouze odpovídající párové hodnoty od stejných jedinců. Znázorněny jsou významné p-hodnoty Wilcoxonova párového testu (s výjimkou E). Data zobrazují mediánové hodnoty, boxy vytyčují horní hranice prvního a třetího kvartilu, a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu.

Výsledky



Obr. 14. Plošný podíl (A_A) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tloušťka stěny aorty ve třech věkových skupinách prasat (Tonar et al., 2015a).

Pro toto srovnání byly segmenty aorty sloučeny. Porovnány byly tři věkové skupiny prasat: suckling pigs - selata, weaners – odstavená selata a fattening pigs – výkrmová prasata. Znárodněny jsou významné statistické p-hodnoty pro Mann-Whitneyův test. Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu.

5.1.3 Korelace složení tunica media s tloušťkou stěny

Výsledky Spearmanovy neparametrické korelace mezi kvantitativními parametry jsou uvedeny v tabulce 9. Plošný podíl tkáňových složek v tunica media koreluje jak s tloušťkou intima-media, tak s tloušťkou stěny aorty.

Tabulka 9. Korelace kvantitativních parametrů.

	$A_A(\text{kolagen})$	$A_A(\text{aktin})$	$A_A(\text{desmin})$	$A_A(\text{vimentin})$	IMT	WT
$A_A(\text{elastin})$	-	-0,60*	-0,52*	-0,37*	0,38*	0,30*
$A_A(\text{kolagen})$	-	-0,57*	-	-	0,22*	0,20*
$A_A(\text{aktin})$	-	-	0,56*	0,43*	-0,54*	-0,44*
$A_A(\text{desmin})$	-	-	-	0,27*	-0,26*	-
$A_A(\text{vimentin})$	-	-	-	-	-0,49*	-0,48*
IMT	-	-	-	-	-	0,97*

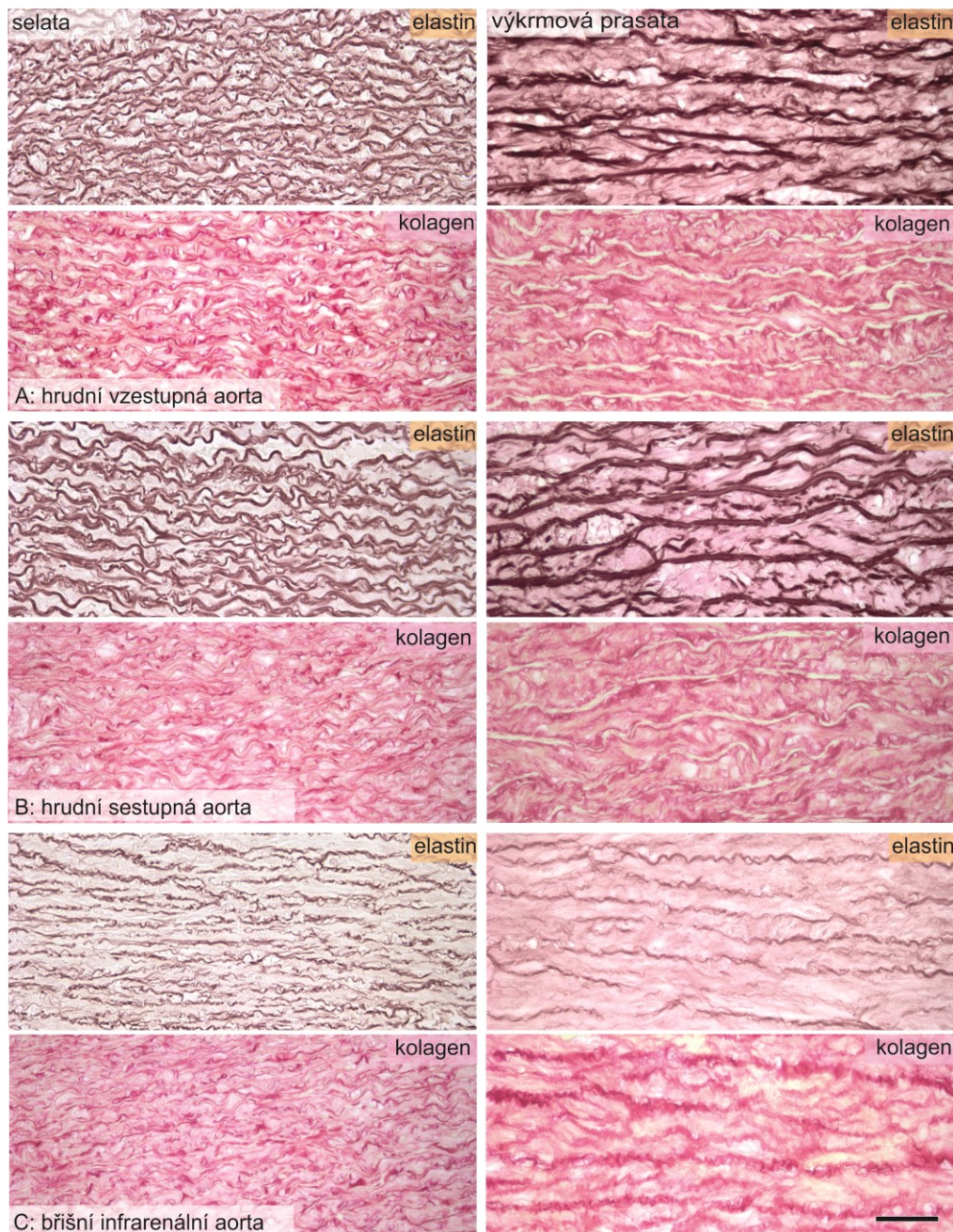
Poznámka: $A_A(\text{komponenta})$ představuje plošný podíl příslušné složky uvnitř referenční oblasti (tunica intima a media); IMT - tloušťka intima-media a WT tloušťka celé stěny. Veškeré statisticky významné korelace ($p < 0,05$) jsou označeny (*). Statisticky nevýznamné korelace ($p > 0,05$) a autokorelace jsou nahrazeny hodnotami (-).

Vybrané mikrofotografie se segmentálními a s věkem souvisejícími rozdíly ve složení aortální stěny jsou znázorněny na obr. 15 a 16. Nižší plošný podíl elastinu a větší podíl kolagenu v hrudní vzestupné aortě ve srovnání se sestupnou aortou nebyly viditelné jednoduchým mikroskopickým vyšetřením (obr. 15A-C), byly zjištěny pouze kvantitativním hodnocením složek stěny cévy. Nicméně rostoucí plošný podíl aktinu v proximodistálním směru byl jasně viditelný i mikroskopickým vyšetřením (obr. 16A, B). Z mikrofotografií je také patrné, že nedošlo k žádnému rozdílu v imunohistochemických markerech hladkých svalových buněk mezi selaty a odstavenými selaty, s výjimkou většího podílu desminu u odstavených selat. Pozitivita na desmin byla nízká v hrudní aortě. Plošný podíl desminu viditelně vzrostl směrem k břišní aortě (obr. 16C, D). Pozitivita na vimentin

Výsledky

byla rovnoměrně rozložena ve stěně všech segmentů a věkových skupin. Vyšší podíl vimentinu v břišní aortě ve srovnání s hrudní aortou byl zjištěn pouze kvantitativním hodnocením (obr. 14E, F), což platilo také pro jeho tendenci ke snižování s vyšším věkem prasat (Tonar et al., 2015a).

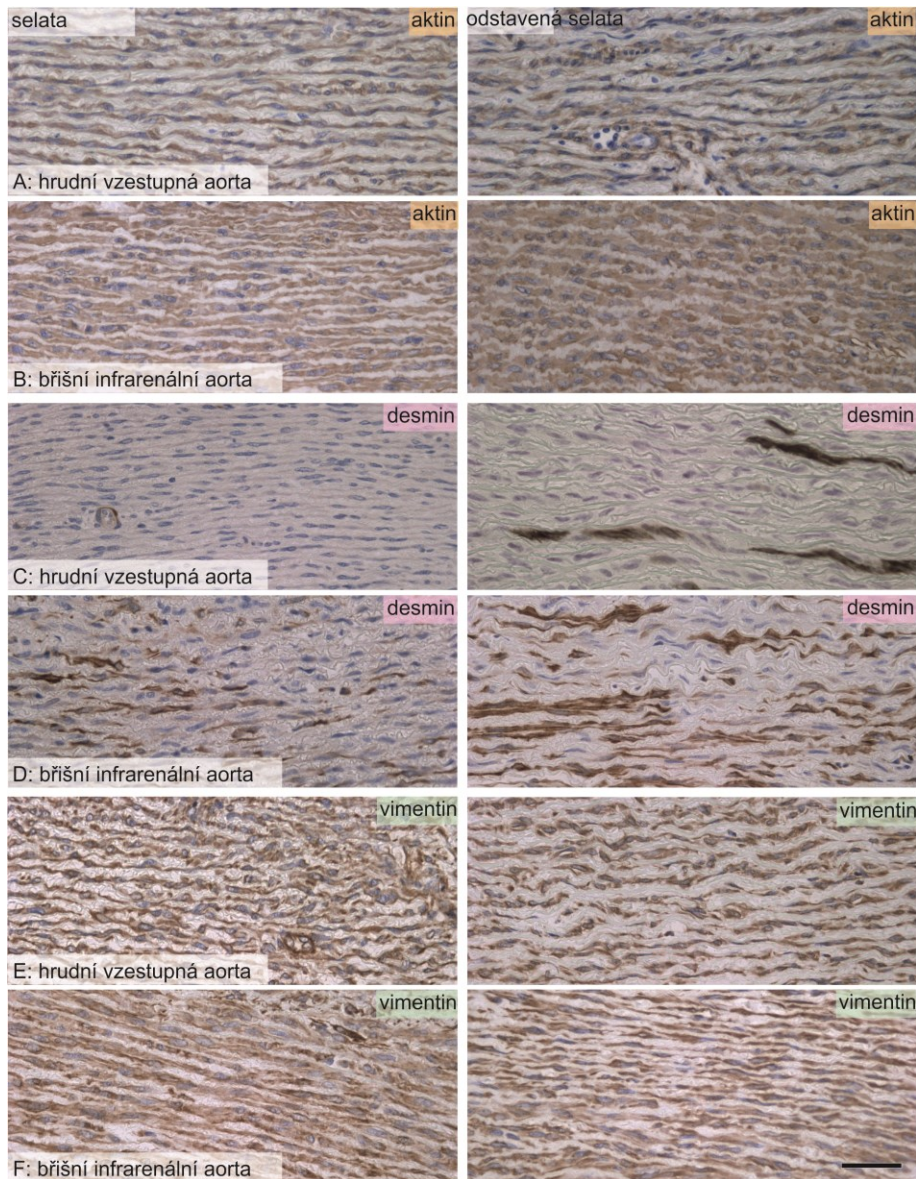
Výsledky



Obr. 15. Obsah elastinu a kolagenu v tunica media aorty u selat (vlevo) a výkrmových prasat (vpravo) (Tonar et al., 2015a).

Výkrmová prasata měla nejnižší plošný podíl elastinu (hnědě barveno) a největší podíl kolagenu (červeně barveno). Ačkoli nebyly pozorovány zřetelné rozdíly mezi plošným podílem elastinu a kolagenu uvnitř tunica media (A) hrudní vzestupné aorty a (B) hrudní sestupné aorty jednoduchým mikroskopickým pozorováním, kvantitativní analýza ukázala, že podíl elastinu byl obecně větší a podíl kolagenu byl obecně menší v hrudní sestupné aortě (B) než v aortě vzestupné (A) (obr. 11A, B). Plošný podíl elastinu v tunica media byl nejmenší v (C) břišní aortě infrarenální, kde byly zjištěny střední hodnoty podílu kolagenu. Elastin byl barven orceinem, kolagen byl barven pikrosiriovou červení; měřítko 50 μm .

Výsledky



Obr. 16. Podíl aktinu, desminu a vimentinu v tunica media aorty selat (vlevo) a odstavených selat (vpravo) (Tonar et al., 2015a).

Plošný podíl aktinu (hnědé barvení A, B) byl vyšší v břišní aortě infrarenální (B) než v aortě vzestupné (A) a nevykazoval žádné rozdíly mezi selaty a odstavenými selaty. Pozitivita na desmin nebyla téměř přítomna (hnědé barvení C, D) v hrudní vzestupné aortě selat, většinou byla omezena na vaskulární profily vasa vasorum. Pozitivita na desmin vzrostla v proximodistálním směru jak u selat, tak u odstavených selat (C a D). Desmin byl častější u odstavených selat než u selat (viz obr. 14). Pozitivita na vimentin (hnědé barvení E a F) byla vyšší v břišní aortě infrarenální než v hrudní vzestupné aortě. Pozitivita na vimentin u odstavených selat byla nižší u selat. Ke kvantitativnímu srovnání (viz obr. 14B-D). Imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu; vizualizace křenovou peroxidázou/diaminobenzidinem a barvení jader hematoxylinem, měřítko 50 μ m.

5.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete

Analýza korelací ukázala, že centrální úhel symetrie oddělující dvě spirály hladkých svalů do dvou hlavních směrů je statisticky nezávislý na lokálním složení stěn aorty prasete. Průměrný úhel mezi směry obou šroubovic byl snížen v oblastech s větším podílem desminu ($r = -0,33$, $p < 0,05$), ale zvýšil se v oblastech s větším podílem elastinu ($r = 0,37$, $p < 0,05$). Zatímco směry, kolem kterých byly distribuce seskupeny ($\mu 1$ a $\mu 2$ pro obě spirály) byly statisticky nezávislé na složení stěny, disperze rozdělení $1/\kappa$ rostly v oblastech s větším podílem elastinu ($r = 0,42$, $p < 0,05$), ale klesaly v oblastech bohatých na desmin ($r = -0,42$, $p < 0,05$). Biologicky významné korelace jsou shrnuty v tabulce 10 (Tonar et al., 2017).

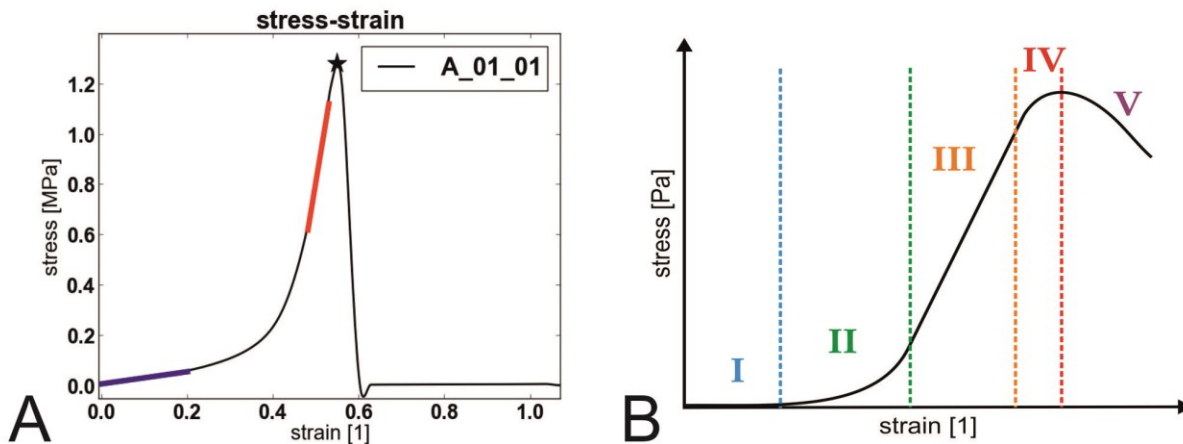
Tabulka 10. Výsledky Pearsonova korelačního testu mezi orientací hladkých svalových buněk, plošnými podíly složek v tunica media aorty a tloušťkou intima-media (IMT) (Tonar et al., 2017).

	centrální úhel symetrie	střední úhel	$\mu 1$	$\mu 2$	κ
aktin	-	-0,24*	-	-	0,24*
vimentin	-	-	-	-	0,22*
desmin	-	-0,33*	-	-	0,42*
elastin	-	0,37*	-	-	-0,42*
kolagen	-	-	-	-	-
IMT	-	-	-	-	-

Veškeré statisticky významné korelace ($p < 0,05$) jsou označeny (*). Korelace, které nemají statistickou významnost ($p > 0,05$), jsou nahrazeny hodnotami (-).

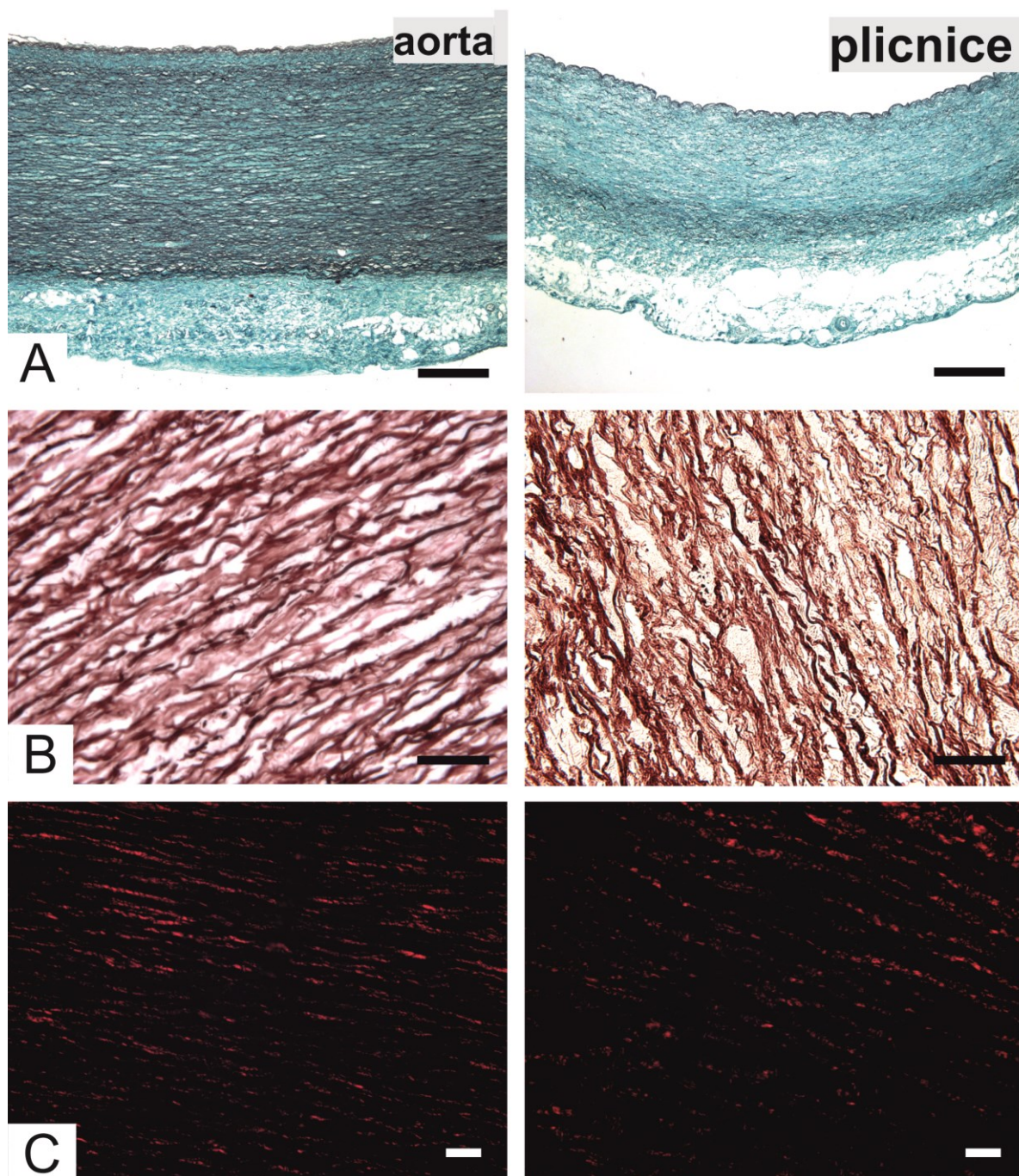
5.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Křivky napětí-deformace vykazovaly podobný tvar pro všechny testované vzorky. Tyto křivky měly typický tvar pro biologické materiály (obr. 17A). Křivky byly nelineární, vykazovaly malou deformační oblast, zpevnění a lineární oblast velkých deformací (obr. 17B). Oblast malých deformací byla charakterizována nízkým gradientem, tj. nízkým Youngovým modulem pružnosti. V lineární oblasti velkých deformací byl Youngův modul pružnosti podstatně vyšší, což představuje zpevnění tkáně s rostoucím napětím (Kubíková et al., 2017a).



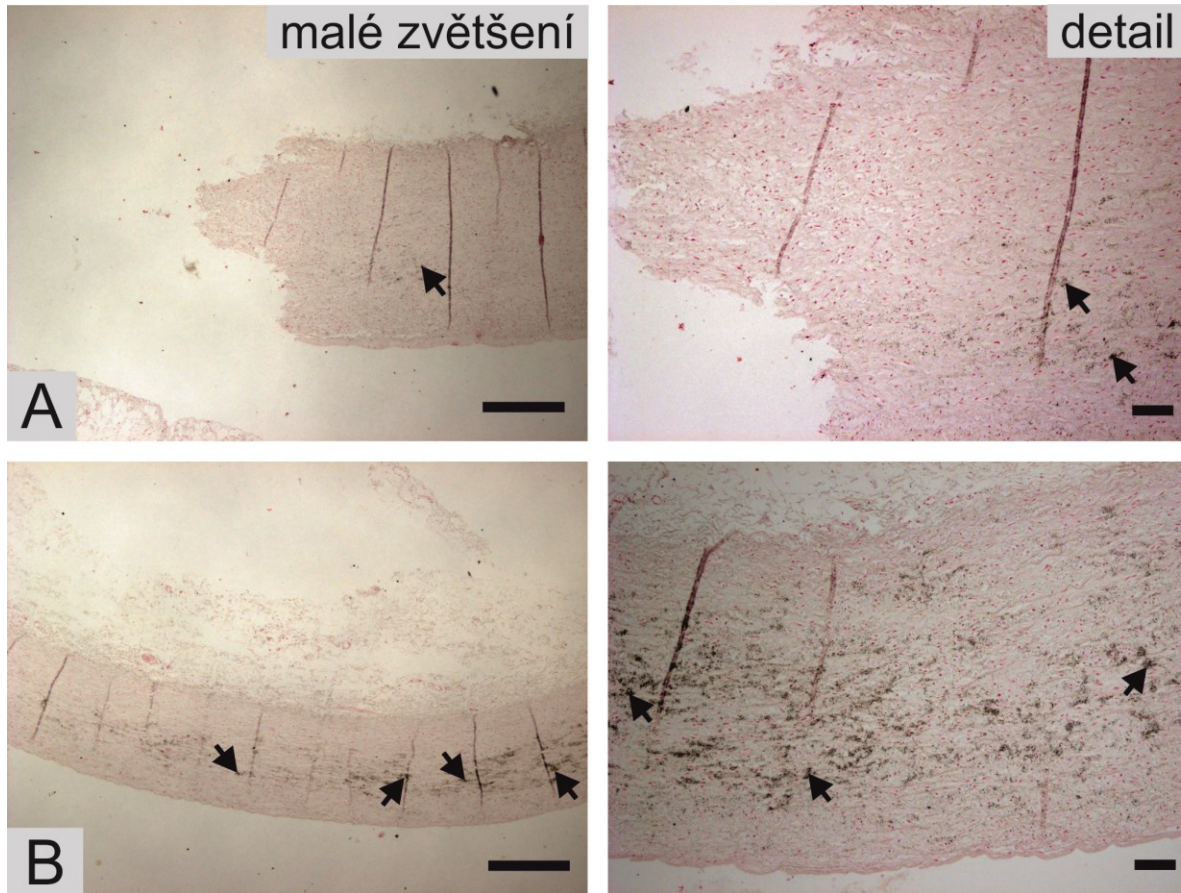
Obr. 17. Křivky z mechanického zatěžování aorty (Kubíková et al., 2017a).

Typická křivka napětí-deformace aorty/plicnice (A). Nelineární křivka napětí-deformace pro viskoelastické materiály (B). Pozn. Stress – napětí; strain – deformace.



Obr. 18. Porovnání aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a).

Celková tloušťka stěny aorty byla větší než celá tloušťka stěny plicnice ($p < 0,001$). Barveno Verhoeffovým hematoxylinem a zeleným trichromem, kolagen zeleně a elastin černě (A). Mezi plošným podílem elastinu v aortě a plicnici nebyl rozdíl. Červeno-hnědá elastická vlákna byla barvena orceinem (B). Mezi plošným podílem kolagenu v aortě a plicnici nebyl žádný rozdíl. Červený kolagen typu I byl obarven pikrosiriovou červení a pozorován v polarizačním světle (C). Měřítka 500 μm (A), 100 μm (B) a 50 μm (C).



Obr. 19. Kalcifikace ve stěně plicnice (Kubíková et al., 2017a).

V oblastech trhlin (A) nebylo více kalcifikace (černé šipky) než v jiných oblastech vzorku (B) vzdálených od oblasti trhliny. Barvení metodou von Kossa. Měřítko 1000 μm (levý sloupec) a 50 μm (pravý sloupec).

Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací (E_1) vykazoval slabě pozitivní korelaci s tloušťkou intima-media (IMT) ($r = 0,34$, $p < 0,05$). Mezní deformace mírně pozitivně korelovala s tloušťkou intima-media ($r = 0,31$, $p < 0,05$), mírně negativně korelovala s plošným podílem elastinu ($r = -0,48$, $p < 0,05$) a mírně pozitivně korelovala s plošným podílem kolagenu ve stěně ($r = 0,31$, $p < 0,05$). Mez pevnosti mírně negativně korelovala s plošným podílem kalcifikace ($r = -0,4$, $p < 0,05$) u aorty. Celková tloušťka stěny aorty byla větší než celková tloušťka stěny plicnice ($p < 0,001$) (obr. 18A). Tloušťka intima-media aorty byla větší než u plicnice ($p < 0,001$). Mezi plošným podílem elastinu v aortě a v plicnici nebyl žádný rozdíl (obr. 18B). Mezi plošným podílem kolagenu v aortě a v plicnici nebyl žádný rozdíl (obr. 18C). Neexistují zjevné rozdíly v rozložení kalcifikace

Výsledky

v oblastech trhlin ve srovnání s ostatními částmi vzorků (obr. 19) (Kubíková et al., 2017a). Tabulka 11 shrnuje výsledky korelačního testu mezi parametry z mechanické a histologické analýzy aort a plicnic.

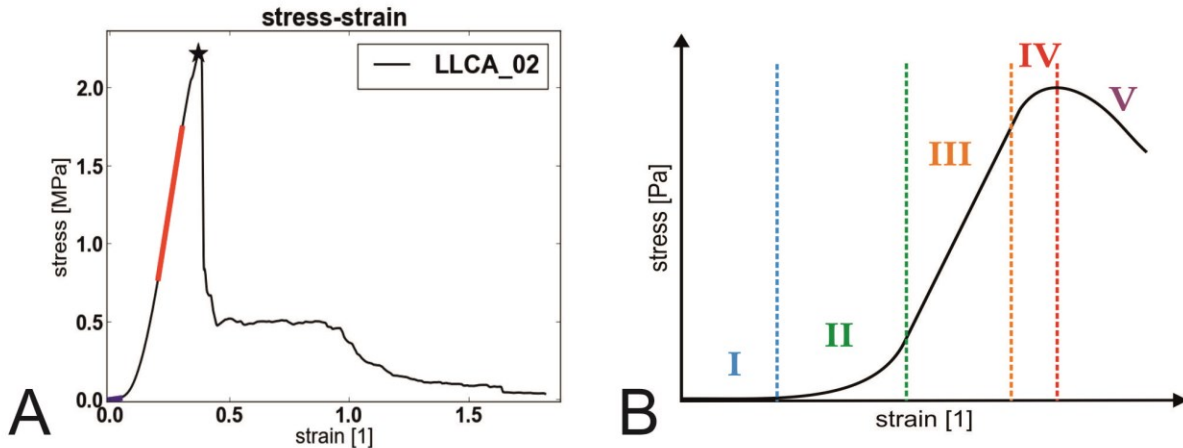
Tabulka 11. Korelace mezi parametry z mechanické a histologické analýzy.

	WT (μm)	IMT (μm)	$A_A(\text{elastin})$	$A_A(\text{kolagen})$	$A_A(\text{kalcifikace})$	$A_A(\text{SMC})$	$A_A(\text{CS})$
E_0 (MPa)	-	-	-	-	-	-	-
E_I (MPa)	-	0,34*	-	-	-	-	-
mezní deformace	-	0,31*	-0,49*	0,31*	-0,4*	-	-
mez pevnosti (MPa)	-	-	-	-	-	-	-

Poznámka: A_A (komponenta) představuje plošný podíl příslušné složky uvnitř stěny elastických tepen; SMC – hladké svalové buňky; CS – chondroitinsulfát; IMT - tloušťka intima-media; WT tloušťka celé stěny; E_0 – Youngův modul pružnosti v oblasti malých deformací; E_I – Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací. Veškeré statisticky významné korelace ($p < 0,05$) jsou označeny (*). Korelace, které nemají statistickou významnost ($p > 0,05$) jsou nahrazeny hodnotami (-).

5.4 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně

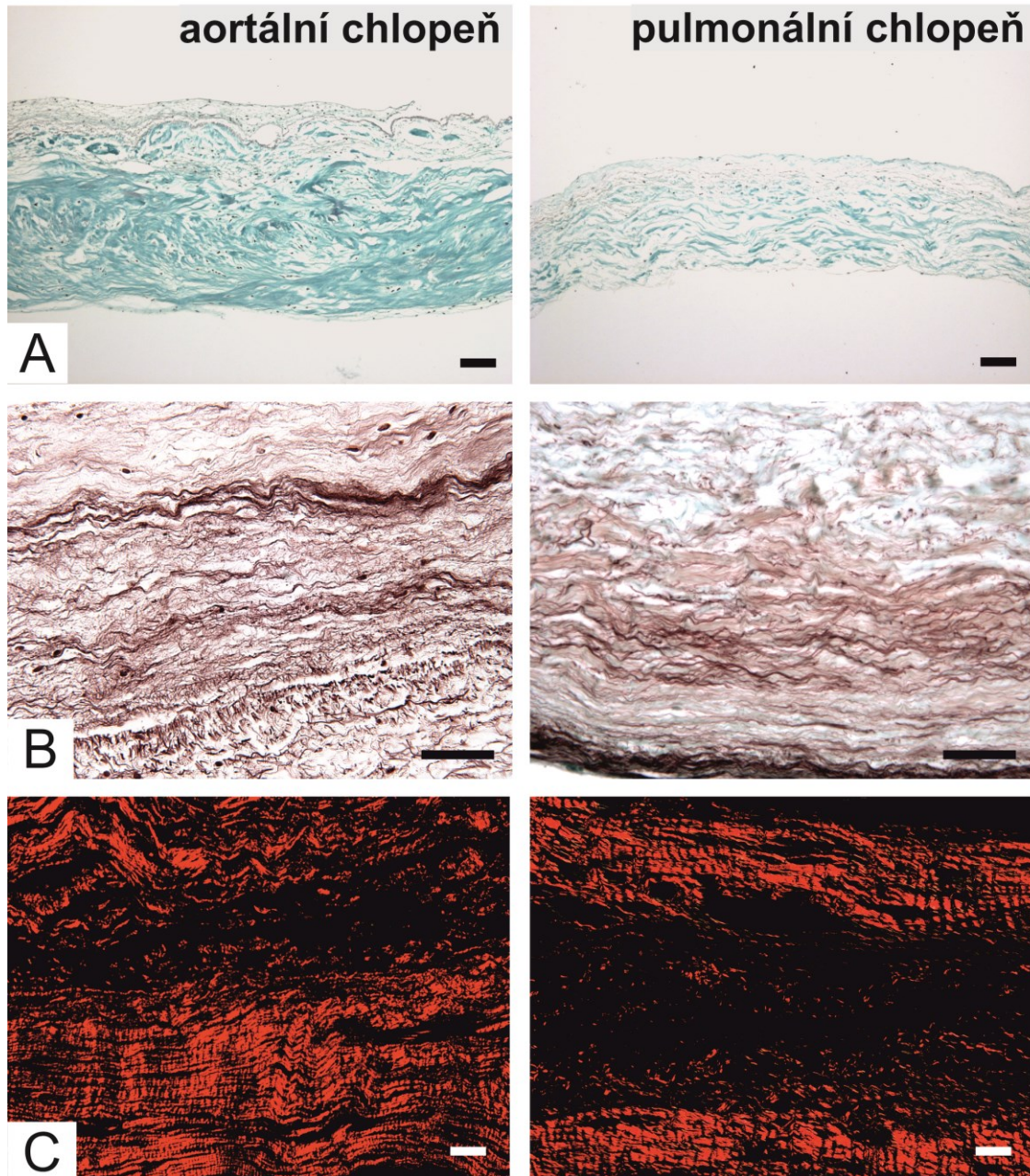
Křivky napětí-deformace vykazovaly podobný tvar ve všech testovaných vzorcích. Křivky napětí-deformace cípů srdečních chlopní měly typický tvar pro biologické materiály (obr. 20A). Křivky byly nelineární, vykazovaly malou deformační oblast, zpevnění a lineární oblast velkých deformací (obr. 20B). Oblast malých deformací byla charakterizována nízkým gradientem, tj. nízkým Youngovým modulem pružnosti. V lineární oblasti velkých deformací byl Youngův modul pružnosti podstatně vyšší, což představuje zpevnění tkáně s rostoucím napětím (Kubíková et al., 2017a).



Obr. 20. Křivky z mechanického zatěžování cípu chlopně (Kubíková et al., 2017a).

Typická křivka napětí-deformace cípu aortální/pulmonální chlopně (A). Nelineární křivka napětí-deformace pro viskoelastické materiály (B). Pozn. Stress – napětí; strain – deformace.

Tloušťka stěny cípů chlopní měla slabou korelaci s Youngovým modulem pružnosti v oblasti malých deformací ($r = 0,29$, $p < 0,05$), středně silnou korelaci s Youngovým modulem pružnosti v oblasti velkých deformací ($r = 0,32$, $p < 0,05$) a slabou korelaci s mezí pevnosti ($r = 0,27$, $p < 0,05$). Tloušťka stěny cípů aortální chlopně byla větší než tloušťka stěny cípů pulmonální chlopně ($p < 0,001$) (obr. 21A). Mezi plošným podílem elastinu v cípech aortální a pulmonální chlopně nebyly žádné rozdíly (obr. 21B). Plošný podíl kolagenu v cípech aortální chlopně byl vyšší než v cípech pulmonální chlopně ($p < 0,05$) (obr. 21C) (Kubíková et al., 2017a).

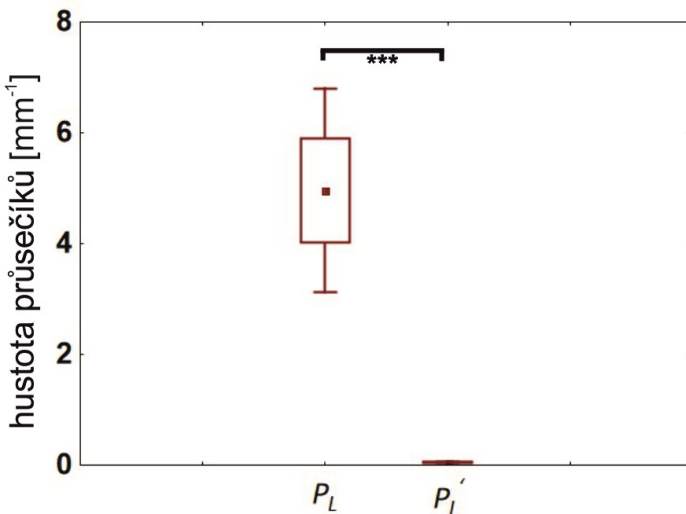


Obr. 21. Porovnání cípů aortální (vlevo) a pulmonální chlopně (vpravo) (Kubíková et al., 2017a).

Celková tloušťka stěny cípů aortálních chlopní byla větší než tloušťka stěny cípů pulmonálních chlopní ($p < 0,001$). Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom obarvily kolagen zeleně a elastin černě (A). Nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi plošným podílem elastinu v cípech aortálních a pulmonálních chlopní. Červeno-hnědá elastická vlákna byla obarvena orceinem. Plošný podíl kolagenu v cípech aortálních chlopní byl vyšší než plošný podíl kolagenu v cípech pulmonálních chlopní ($p < 0,05$). Červený kolagen typu I byl obarven pikrosiriovou červení a byl pozorován v polarizačním světle. Měřítka 500 μm (A), 100 μm (B) a 50 μm (C).

5.5 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici

Teoretická hustota průsečíků profilů trhliny s elastickými vlákny byla vyšší než skutečná hustota průsečíků ($p < 0,001$) (obr. 22). Elastická vlákna i po kryoprezervaci zůstávají hodnotným prvkem stěny elastických cév (Kubíková et al., 2017a).



Obr. 22. Porovnání teoretické (P_L) a reálné (P_L') hustoty průsečíků mezi trhlinou a elastickými vlákny (Kubíková et al., 2017a).

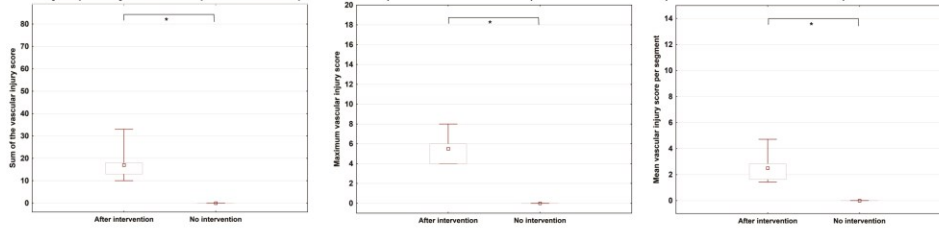
Teoretická délková hustota průsečíků profilů trhliny s elastickými vlákny byla vyšší než skutečná hustota průsečíků ($p < 0.001$).

5.6 Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů

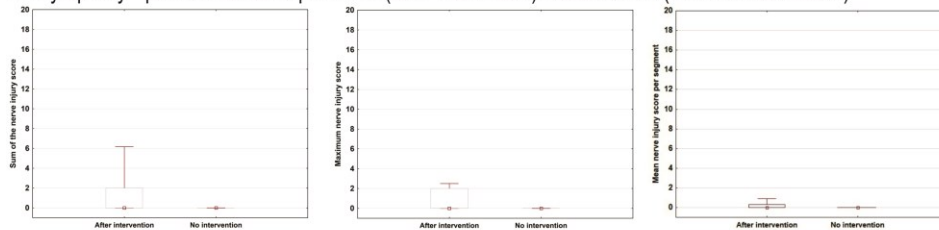
Skórovací systém ukázal, že součet, maximální a střední počet bodů poškození cév byl vyšší po ablací než u neošetřené renální tepny jak u zvířat ošetřených pomocí katetru Symplicity Flex (obr. 23A), tak u zvířat ošetřených za použitím katetru EnligHTN (obr. 23C). U zvířat ošetřovaných katetrem Symplicity Flex skóre nervového poškození nedosáhlo významného rozdílu ve srovnání s nervovými pleteněmi obklopujícími renální tepnu bez ablace (obrázek 23B). U zvířat, u kterých byl použit katetr EnligHTN, bylo skóre poškození nervů vyšší po zákroku než u nervů neošetřené renální tepny (obr. 23D). Primární údaje použité pro statistiky jsou shrnuty v tabulce 5 (Táborský et al., 2017).

Výsledky

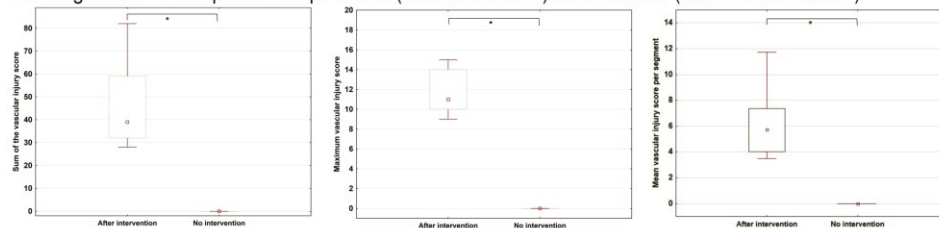
A: Symplicity - cévní poškození po ablaci (after interention) a bez ablace (without intervention)



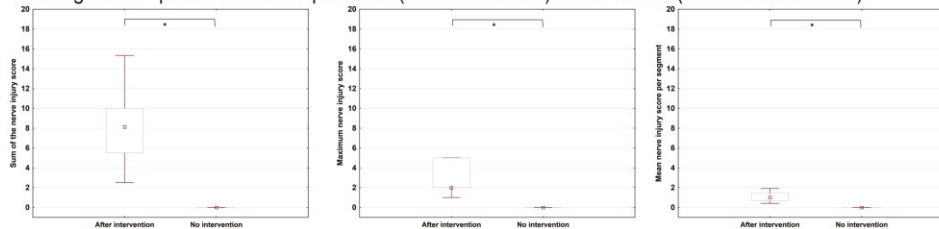
B: Symplicity - poškození nervů po ablaci (after interention) a bez ablace (without intervention)



C: EnligHTNA - cévní poškození po ablaci (after interention) a bez ablace (without intervention)



D: EnligHTNA - poškození nervů po ablaci (after interention) a bez ablace (without intervention)



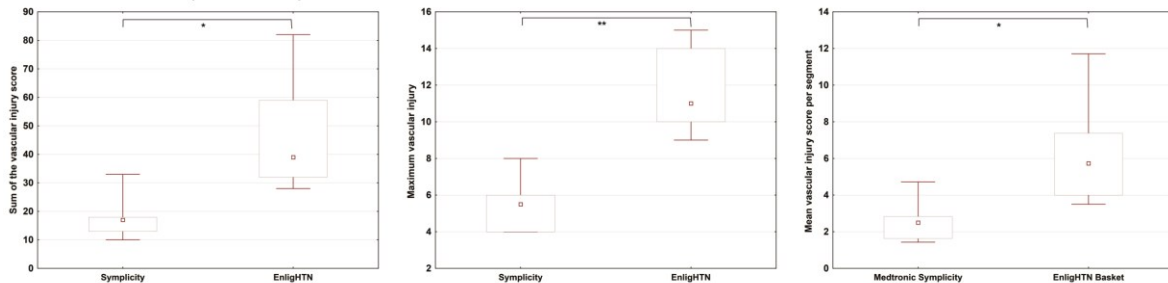
Obr. 23. Porovnání poškození cév a nervů u obou katetrů v renálních tepnách po ablaci a bez ablace.

U zvířat ošetřených katetrem Symplicity Flex bylo skóre poškození renálních tepen vyšší po zásahu než bez zásahu (A). U zvířat ošetřených přípravkem Symplicity Flex skóre poranění nervů nedosáhlo významného rozdílu ve srovnání s nervy obklopujícími neošetřenou renální tepnu (B). U zvířat ošetřených katetrem EnligHTN bylo skóre poškození renální tepny vyšší po zákroku než u renální tepny bez zásahu (C). U zvířat ošetřených katetrem EnligHTN bylo skóre poškození nervů vyšší po zákroku než u nervů neošetřené renální tepny (D). Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu, a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu. Statisticky významné rozdíly byly vyznačeny (* $p < 0,05$), Wilcoxonův párový test. Pozn. Sum of the vascular/nerve injury score – součet bodů cévního/nervového poškození, maximum vascular/nerve injury – maximální cévní/nervové poškození, mean vascular/nerve injury score per segment – průměrný počet bodů cévního/nervového poškození na segment.

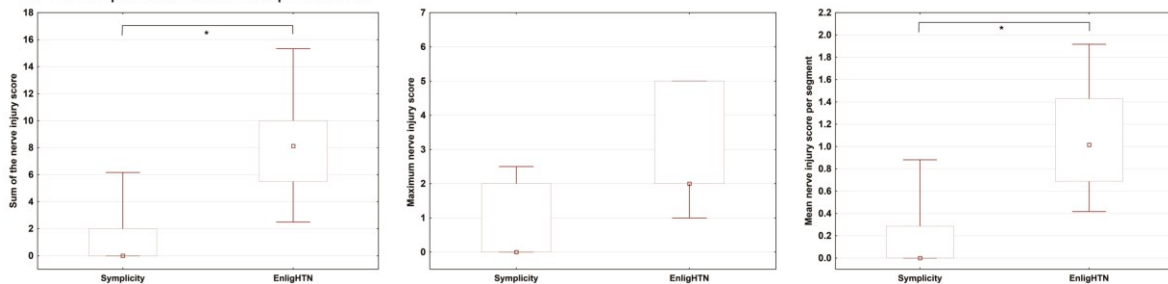
Výsledky

Použití katetru EnligHTN vedlo k většímu poškození renální tepny ve srovnání s katetrem Symplicity Flex (obr. 24A). Použitím EnligHTN katetru bylo dosaženo většího součtu bodů poškození nervů a průměrného počtu bodů poranění nervů ve srovnání s účinky katetru Symplicity Flex (obr. 24B) (Táborský et al., 2017).

A: Skóre cévního poškození po ablaci.



B: Skóre poškození nervů po ablaci.



Obr. 24. Porovnání účinků dvou typů katetrů na renální tepnu a nervová vlákna probíhající kolem ní po ablaci (Táborský et al., 2017).

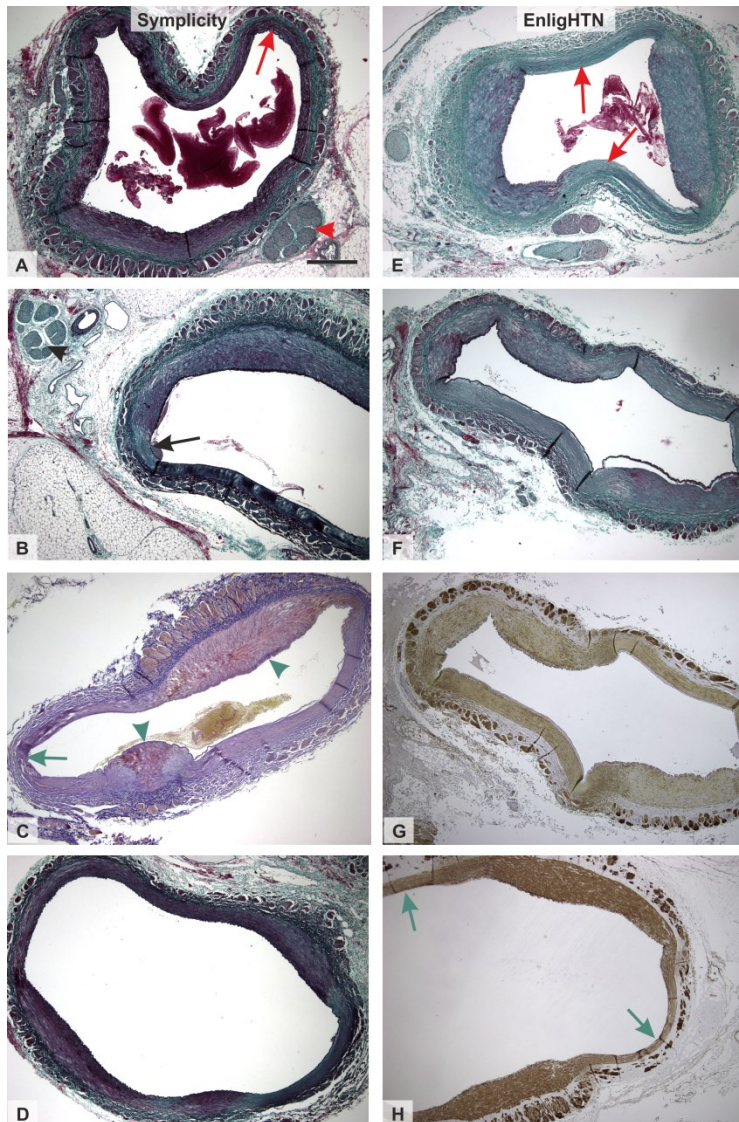
Použití katetru EnligHTN vedlo k většímu poškození renální tepny ve srovnání s katetrem Symplicity Flex (A). Použití EnligHTN katetru vedlo k většímu součtu bodů poranění nervů a k průměrnému skóre poranění nervů ve srovnání s katetrem Symplicity Flex (B). Data jsou zobrazena jako střední hodnoty, boxy představují horní hranice prvního a třetího kvartilu, a úsečky vymezují minimální a maximální hodnoty pro každou skupinu. Statisticky významné rozdíly byly vyznačeny (* $p < 0,05$, ** $0,01 > p > 0,001$), Mann Whitney U test. Pozn. Sum of the vascular/nerve injury score – součet bodů cévního/nervového poškození, maximum vascular/nerve injury – maximální cévní/nervové poškození, mean vascular/nerve injury score per segment – průměrný počet bodů cévního/nervového poškození na segment.

Výsledky

Typické histologické nálezy nacházející se ve stěně renálních tepen po ablacii katetry jsou ukázány na obr. 25. V tepnách ošetřených katetrem Symplicity byly léze cévních stěn méně rozsáhlé a často postihovaly pouze jeden kvadrant cévní části (obr. 25A, B). U tepen ošetřených katetrem EnligHTN byly vaskulární léze rozsáhlejší a často postihly několik kvadrantů na příčných řezech několika segmentů (obr. 25E, H). Kromě cirkulární vrstvy hladkých svalů měly všechny renální tepny, vyšetřené v tomto zvířecím modelu, také další podélnou vrstvu hladkých svalových buněk (obr. 25) (Táborský et al., 2017).

Typické nálezy v nervových vláknech doprovázejících renální tepny jsou znázorněny na obr. 26. V mnoha částech byly nalezeny zdravé a morfologicky normální nervy, často ve směru opačném k poškozenému kvadrantu tepny (obr. 26). Všechny typy poranění nervů ukázané na obr. 12 a uvedené v tabulce 6 byly častější u zvířat, kterým byly ošetřeny katetrem EnligHTN, ve srovnání se zvířaty ošetřenými katetrem Symplicity (Táborský et al., 2017).

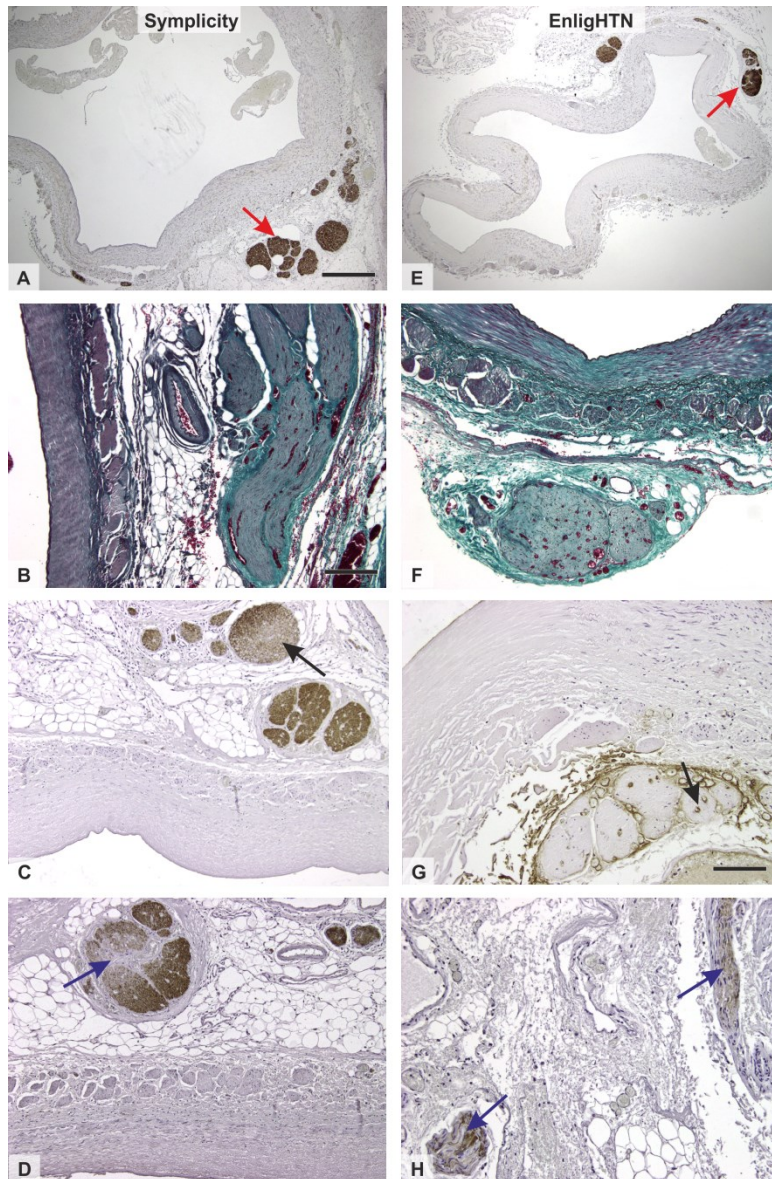
Výsledky



Obr. 25. Příklady histologických nálezů cévního poškození u obou skupin zvířat po ablaci s použitím katetru Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN katetru (vpravo) (Táborský et al., 2017).

U tepen ošetřených katetrem Symplicity byly léze cévní stěny méně rozsáhlé, často postihující pouze jeden kvadrant cévní části (A, B, šipky). Doprovodné nervy byly často zcela normální a nedotčené (A, B, špičky šipek). Někdy bylo oslabení stěny a denaturace kolagenu při ztrátě hladkého svalstva (C, šipka) doprovázeno sousedícím edémem tkáňové vrstvy (C, špička šipky). U jednoho zvířete bylo postiženo více kvadrantů (D). U tepen ošetřených katetrem EnligHTN byly cévní léze rozsáhlejší a často ovlivňovaly více kvadrantů v průřezích několika segmentů (E-H, šipky). Všechny snímky ukazují, že renální tepny u ovci mají nejen kruhovou vrstvu hladkého svalstva, ale také značně tlustou vrstvu podélného hladkého svalstva. Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (A, B, E-F), Malloryho trichrom (C), imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu (G-H, tmavě hnědá pozitivita). Měřítka 500 μ m (A-H).

Výsledky



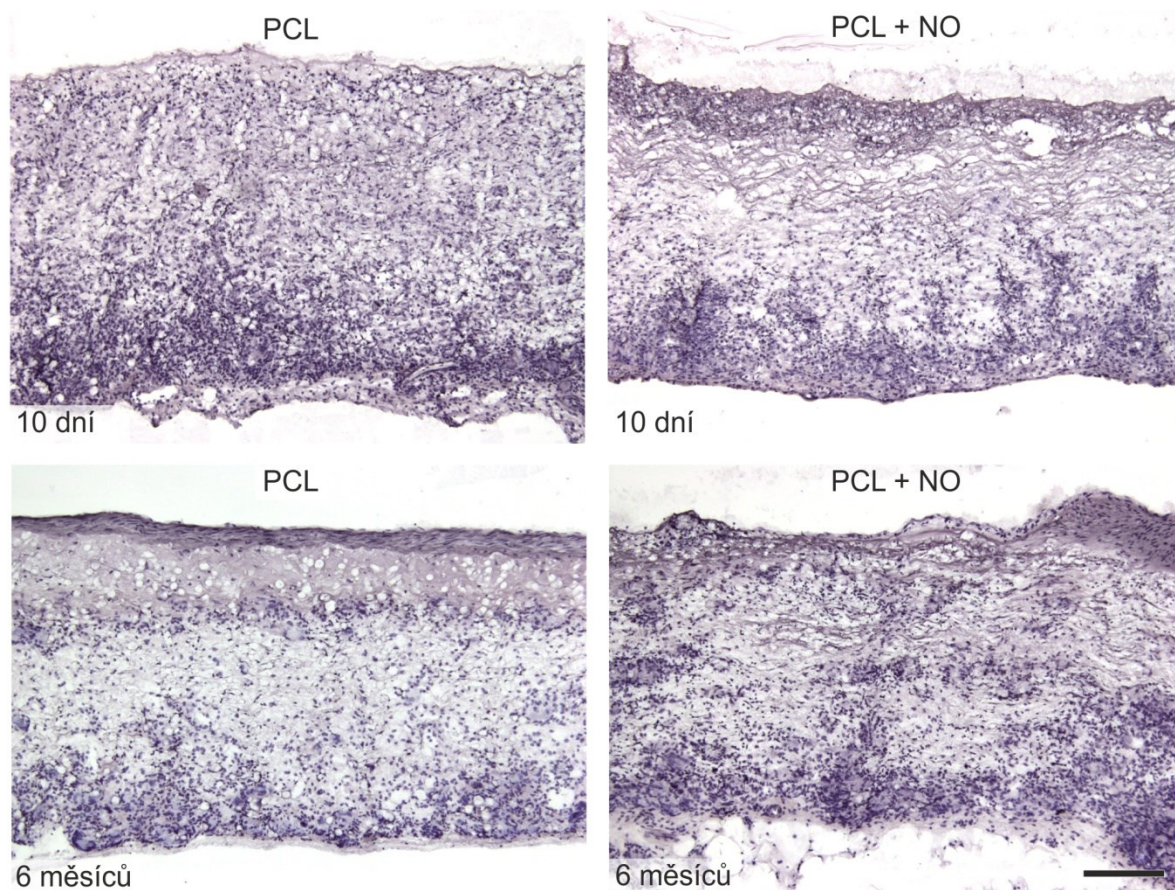
Obr. 26. Příklady histologických nálezů poškozených nervů u obou skupin zvířat po ablaci katetrem Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN (vpravo) (Táborský et al., 2017).

V mnoha částech byly nalezeny zdravé a morfologicky a imunohistochemicky normální nervy (A, E, červené šipky) v blízkosti renální tepny. V obou skupinách zvířat byla běžně nalezena hyperémie nervů bez dalšího poškození nervové mikrostruktury (B, F). S výjimkou úplné imunohistochemické negativity (zde neuvedené viz obr. 12) byly některé nervové svazky částečně poškozeny a vykazovaly lokální ztrátu imunopozitivity na neurofilamentový protein (C) nebo tyrosin hydroxylázu (D, H). V některých nervových svazcích byly mikrocév ve vasa nervorum (G, černá šipka) roztaženy nebo zničeny. Imunohistochemická detekce neurofilamentového proteinu (A, C, E, tmavě hnědá pozitivita), imunohistochemická detekce tyrosin hydroxylázy (D, H, tmavě hnědá pozitivita), Verhoeffův hematoxylin a zelený trichrom (B, F). Měřítka 500 μm (A, E), 200 μm (B-D, F) a 100 μm .

5.7 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

5.7.1 Kvantitativní analýza

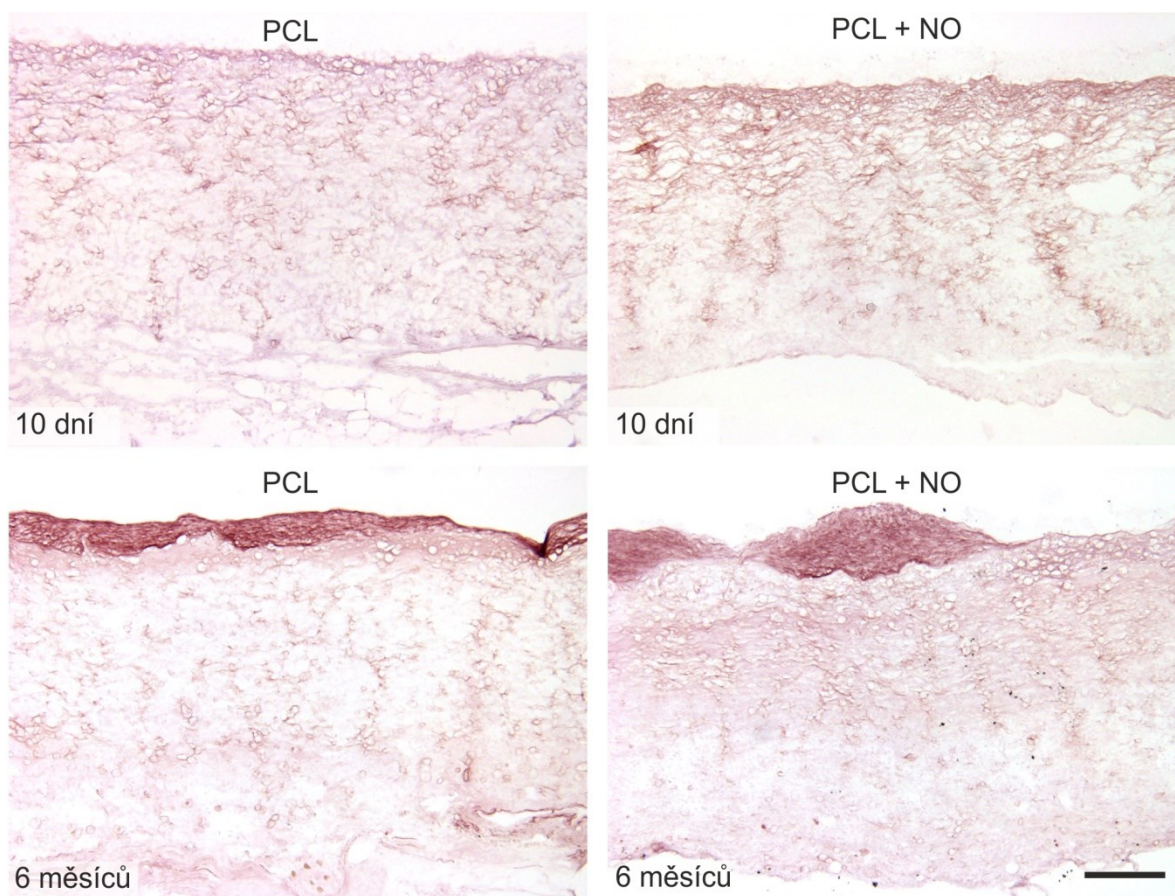
Parametry, které jsme kvantitativně hodnotili, jsou uvedeny v legendách obrázků 27-30: tloušťka štěpu a relativní distribuce a hustota profilů jader buněk prostoupených štěpem (obr. 27), plošný podíl elastinu v náhradě (obr. 28), plošný podíl kolagenu v náhradě (obr. 29) a plošný podíl α -hladkosvalového aktinu (obr. 30).



Obr. 27. Vzorky barvené hematoxylinem-eosinem použité pro hodnocení tloušťky štěpu a relativní distribuce a hustoty profilů jader buněk prostupujících štěpem.

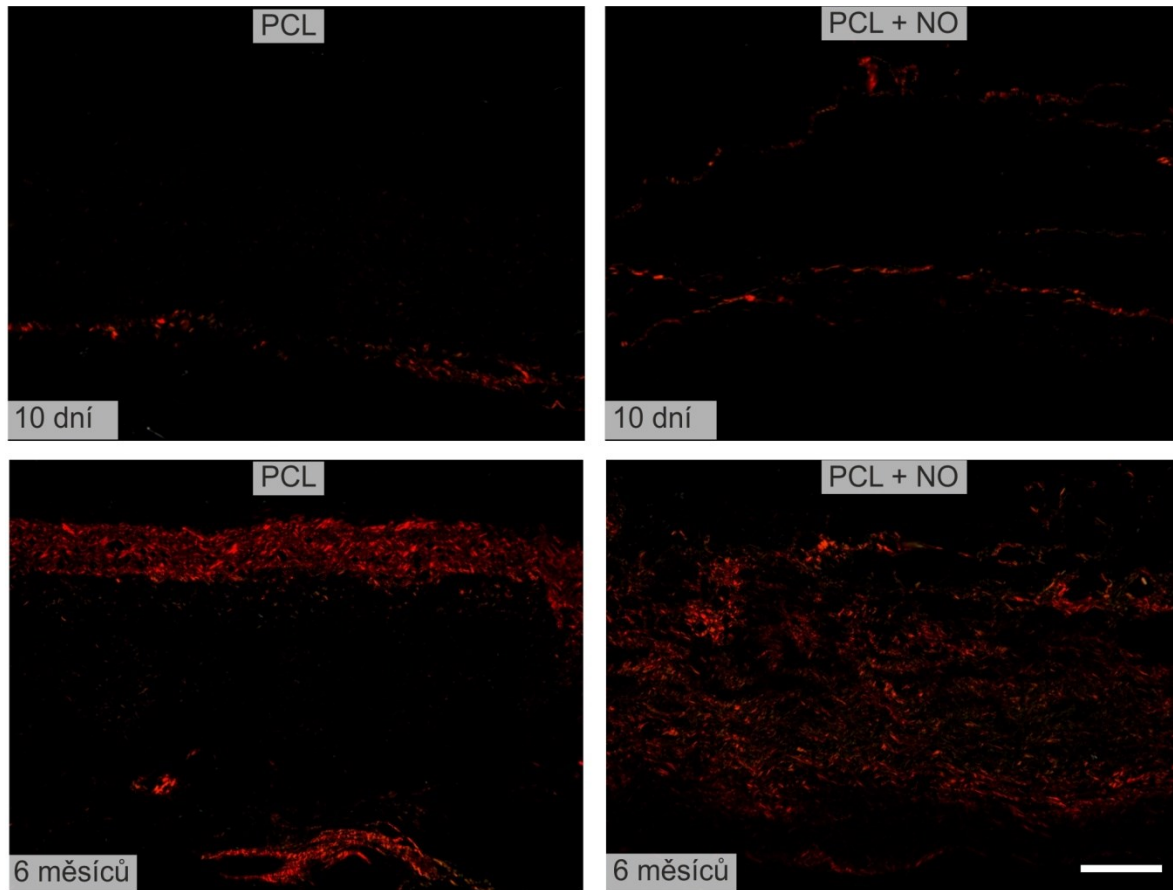
Všechny vzorky jsou orientovány tak, aby průsvit směřoval nahoru. Ačkoli některé z jednotlivých vzorků vykazovaly určité preferenční rozložení jader, statistická kvantifikace nevykazovala žádné rozdíly při porovnávání typů štěpů nebo skupin s různými časy implantace. Vnitřní třetina tloušťky štěpu byla osídlena buňkami hustěji než střední ($p < 0,01$) a vnější vrstva ($p < 0,05$). Měřítko 200 μm . Pozn. PCL – polycaprolaktan; NO – oxid dusnatý.

Výsledky



Obr. 28. Vzorke barvené orceinem, použité pro hodnocení plošného podílu elastinu (tmavě hnědý) v cévní náhradě.

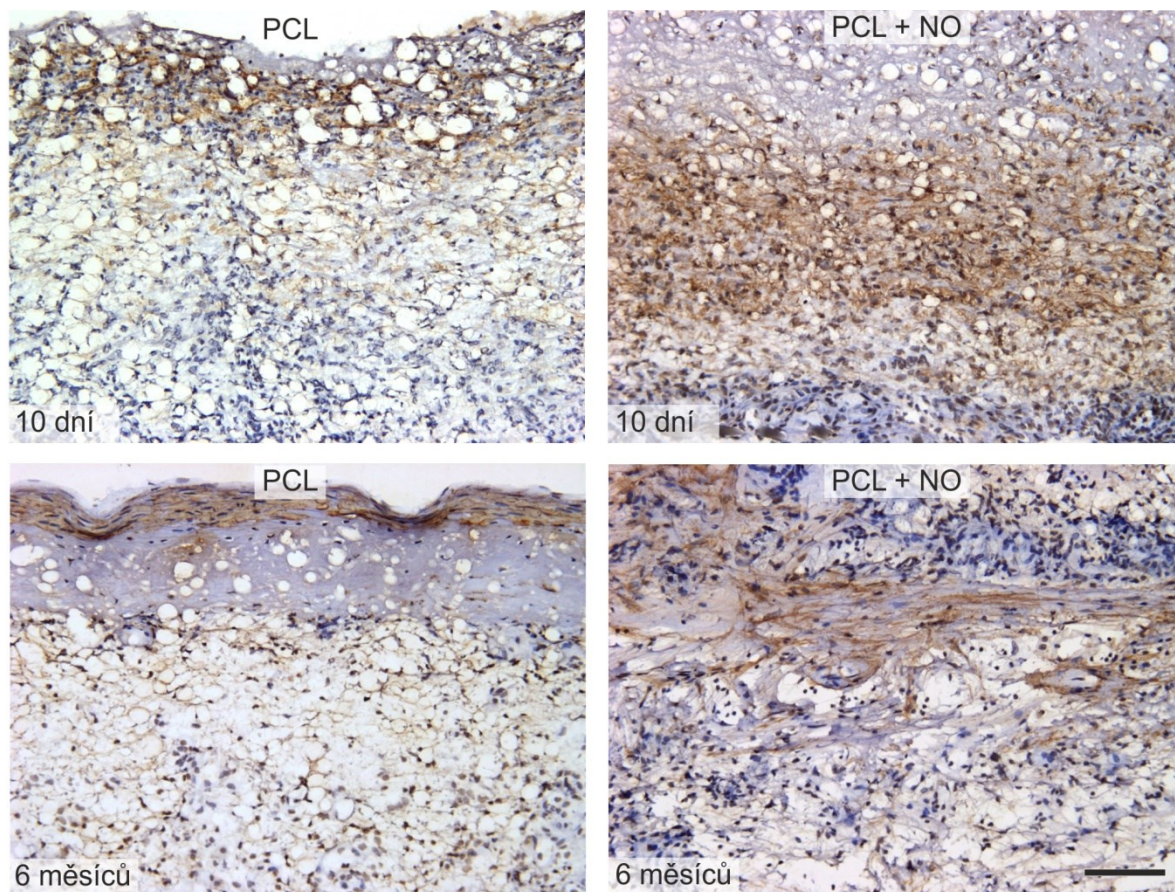
Všechny vzorky jsou orientovány tak, aby průsvit směřoval nahoru. Po 10 dnech od implantace byly zjištěny jen zanedbatelné nebo žádné stopy elastinu (většina tmavě hnědých skvrn jsou falešně pozitivní skvrny na okrajích mikrostruktury štěpu). Po 6 měsících byly oba typy štěpů pokryty neointimálním endotelem, pod kterým byly uloženy různé elastické vrstvy. Podíl elastinu byl vyšší po 6 měsících než po 10 dnech ($p < 0,001$). Měřítka 200 μm . Pozn. PCL – polykaprolaktan; NO – oxid dusnatý.



Obr. 29. Vzorky barvené pikrosiriovou červení a pozorované v polarizačním světle pro hodnocení plošného podílu kolagenu (červený) v cévní náhradě.

Všechny vzorky jsou orientovány tak, aby průsvit směřoval nahoru. Po 10 dnech byla v obou typech štěpů zjištěna přítomnost kolagenu v blízkosti vnějšího okraje štěpu. Malé množství kolagenu také v adluminálních částech štěpu bylo v některých vzorcích se štěpem obohacným o oxid dusnatý. Po 6 měsících bylo přítomno větší množství kolagenu než po 10 dnech ($p < 0,001$). Štěpy ze skupiny vzorků obohacných oxidem dusnatým vykazovaly tendenci k homogennějšímu rozložení kolagenu. Celkový plošný podíl kolagenu byl srovnatelný u obou typů štěpů. Měřítka 200 μm . Pozn. PCL – polykaprolaktan; NO – oxid dusnatý.

Výsledky



Obr. 30. Imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu (hnědá) použitá pro hodnocení jeho plošného podílu v cévní náhradě.

Všechny vzorky jsou orientovány tak, aby průsvit směřoval nahoru. Po 10 dnech byly buňky vykazující pozitivitu na α -hladkosvalový aktin v sousedství s průsvitem štěpů z čistého polykaprolaktanu. Štěpy obohacené o oxid dusnatý příležitostně vykazovaly také aktin-pozitivní buňky ve středních vrstvách štěpu. Po 6 měsících měly oba typy štěpů dobře diferencovanou vaskulární vrstvu, která vykazovala pravidelné uspořádání hladkých svalových buněk vřetenovitého tvaru. Navíc štěpy obohacené o oxid dusnatý vykazovaly oblasti aktin-pozitivních buněk také v hlubších vrstvách. Množství aktinu bylo srovnatelné u obou typů štěpů. Měřítko 100 μ m. Pozn. PCL – polykaprolaktan; NO – oxid dusnatý.

Výsledky

Průměrný počet profilů jader na jednotku plochy celého štěpu silně koreloval jak s počtem profilů jader na jednotku plochy ve vnitřní (adluminální) třetině tloušťky štěpu (Spearman $r = 0,79$), tak s počtem profilů jader na jednotku plochy ve střední třetině tloušťky štěpu ($r = 0,78$), ale také s počtem profilů jader na jednotku plochy ve vnější (abluminální) třetině tloušťky štěpu ($r = 0,85$). To znamená, že u vrstev s velkou buněčnou infiltrací byly všechny vrstvy statisticky zodpovědné za celkovou vysokou buněčnou infiltraci, ale nejvíce vnější vrstva. Prostoupení vnitřní vrstvy buňkami byla statisticky nezávislá na prostoupení střední a vnější vrstvy. Prostoupení střední vrstvy buňkami vykazovala mírnou korelaci s vnější vrstvou ($r = 0,59$). Počet profilů jader na jednotku plochy ve střední třetině tloušťky štěpu středně koreloval ($r = 0,66$) s plošným podílem hladkosvalového aktinu v celé náhradě. Plošný podíl kolagenu v náhradě mírně až silně pozitivně koreloval s plošným podílem elastinu v náhradě ($r = 0,74$). To znamená, že vzorky s větším plošným podílem kolagenu obsahovaly také více elastinu a naopak.

Vzhledem k malému počtu vzorků byly pro účely porovnání typu cévní náhrady sloučeny oba časy implantace vzorků (10 dní a 6 měsíců). Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly při porovnávání vzorků s náhradami z čistého polykaprolaktanu a obohaceného o oxid dusnatý.

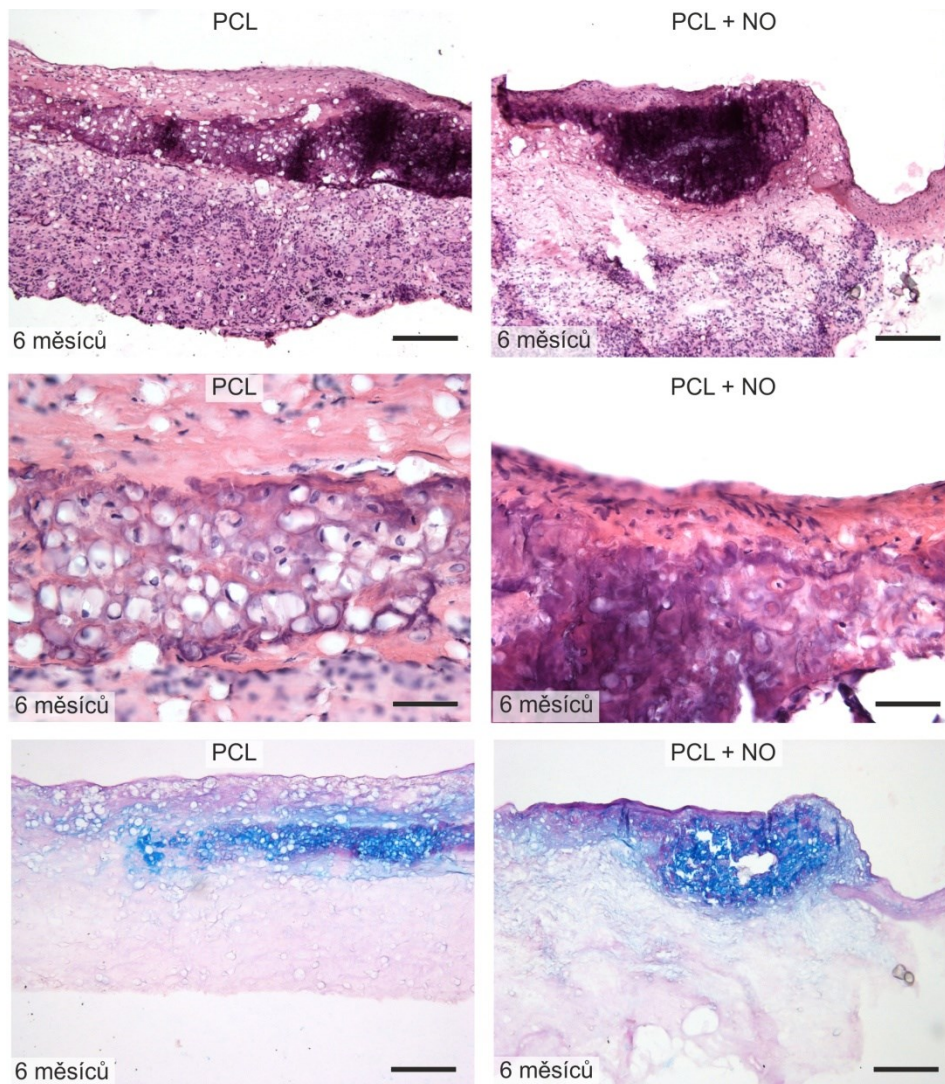
Vzhledem k malému počtu vzorků byly pro účely porovnání vzorků podle doby implantace sloučeny oba typy náhrad (z čistého polykaprolaktanu a obohaceného polykaprolaktanu o oxid dusnatý). Plošný podíl jak elastinu, tak kolagenu byl vyšší ve vzorcích po 6 měsících od implantace ve srovnání se vzorky po 10 dnech ($p < 0,001$). Dalším rozdílem velmi blízko statistické významnosti ($p = 0,051$) byla tendence k větší vzdálenosti jader buněk od vnější hranice štěpu po 10 dnech než po 6 měsících, tj. buňky byly blíže k adluminálnímu povrchu po 10 dnech než po 6 měsících. Jinak nebyly nalezeny žádné další rozdíly.

5.7.2 Ostatní nálezy

U jednoho vzorku z celkového počtu 14 došlo k uzavření jeho průsvitu. Všechny ostatní vzorky měly volně průchodný průsvit bez známek trombózy. Po šesti měsících byla

Výsledky

nalezena metaplazie v chrupavku u jednoho štěpu z čistého polykaprolaktanu a také u jednoho štěpu obohaceného o oxid dusnatý těsně u napojení mezi aortou a našitou náhradou (obr. 31).

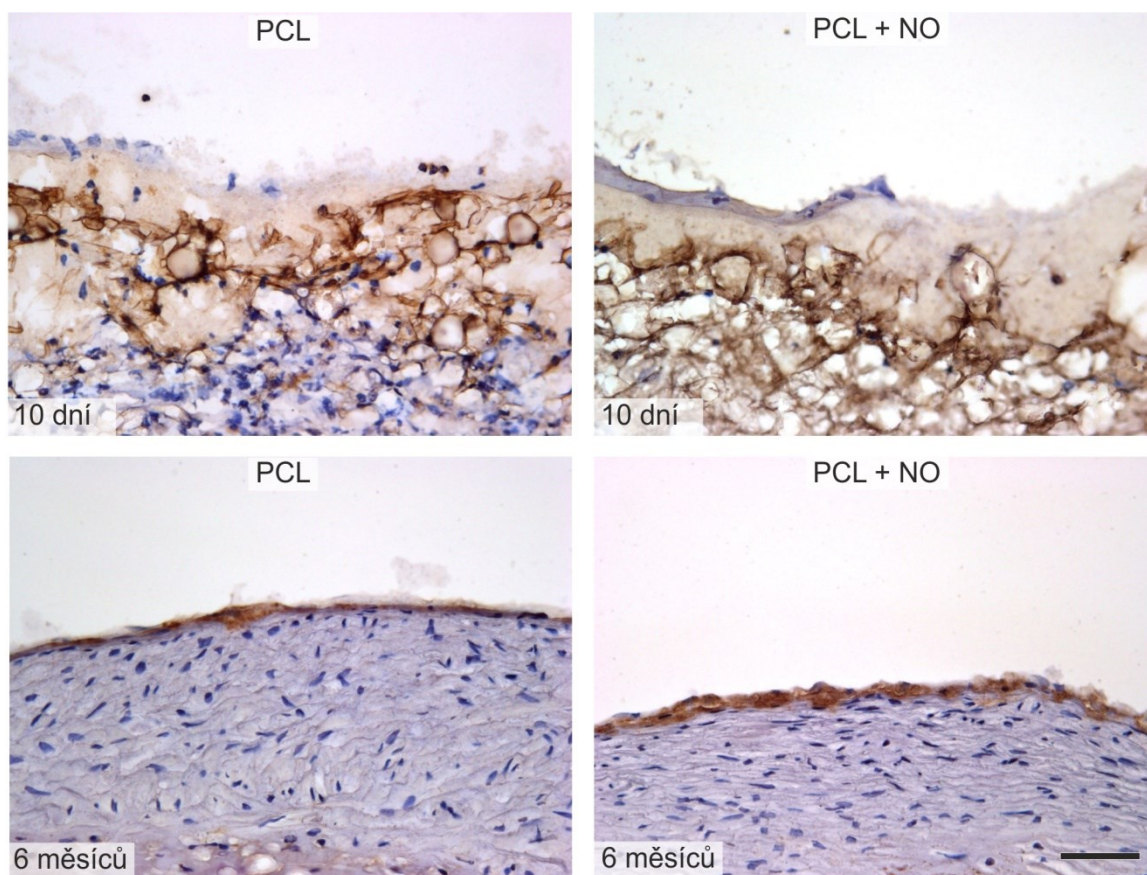


Obr. 31. Metaplazie v chrupavku v cévních náhradách po 6 měsících.

Jeden vzorek s čistým polykaprolaktanovým štěpem a jeden vzorek se štěpem obohaceným o oxid dusnatý obsahoval oblasti pojivové tkáně morfologicky připomínající chrupavku. Obě byly nalezeny těsně u napojení štěpu na aortální segmenty. Buňky morfologicky připomínaly chondroblasty a chondrocyty (prostřední snímky) a mezibuněčná hmota byla slabě pozitivní při barvení na neutrální glykosaminoglykany (barvení PAS, spodní snímky) a silně pozitivní vůči kyselým glykosaminoglykanům (barvení alciánovou modří, spodní snímky) typické pro chrupavku. Hematoxylin-eosin (horní čtveřice snímků), PAS kombinovaný s alciánovou modří (spodní snímky); měřítko 200 μm . Pozn. PCL – polykaprolaktan; NO – oxid dusnatý.

Výsledky

Po 10 dnech od implantace byla proximální a distální část náhrady sousedící s aortou vystlána endotelem u obou typů náhrad, přičemž přibližně polovina štěpu zůstala bez morfologicky diferencovaného endotelu (obr. 32). Ale ani oblasti bez endotelu nevykazovaly žádné známky trombózy. Po 10 dnech byl endotel negativní na jakýkoliv z endoteliálních znaků (von Willebrandův faktor, CD34, CD31). Po šesti měsících byly všechny vzorky kompletně pokryty endotelem pozitivním na von Willebrandův faktor (obr. 32), ale negativním na CD34 a CD31. Při endotelizaci obou typů štěpů nebyl zaznamenán žádný rozdíl.



Obr. 32. Endotelová výstelka u obou typů náhrad.

Po 10 dnech byly endoteliální buňky negativní vůči jakémukoliv imunohistochemickému znaku, ale byly morfologicky odlišné. Periferní oblasti obou typů štěpů byly pokryty endotelovými buňkami, ale centrální oblasti zabírající přibližně polovinu štěpů nebyly pokryty endotelem ani u náhrad z čistého polykaprolaktanu, ani obohaceného o oxid dusnatý. Po šesti měsících byly oba typy štěpů zcela pokryty endotelem pozitivním na von Willebrandův faktor. Měřítko 50 μ m. Pozn. PCL – polykaprolaktan; NO – oxid dusnatý.

6 Diskuze

6.1 Složení aorty prasete v různých proximodistálních segmentech a v závislosti na stáří

6.1.1 Složení hrudní aorty je odlišné od složení břišní aorty

V segmentech prasečí aorty v proximodistálním směru se obsah elastinu zvýšil a dosáhl svého maxima v hrudní sestupné aortě a pak se snížil na minimum v břišní aortě. Překvapivě byla stěna suprarenální aorty srovnatelná se stěnou infrarenální břišní aorty. Infrarenální břišní aorta vykazovala tendenci k nižšímu obsahu elastinu (obr. 13A) a vyšší pozitivitě na vimentin (obr. 13D) než suprarenální aorta, ale žádný z těchto rozdílů nebyl statisticky významný. Vyšší obsah elastinu v hrudní aortě ve srovnání s břišní aortou, který jsme pozorovali v naší studii, je v souladu s výsledky několika studií u různých savců (Guo and Kassab, 2004; Sokolis et al., 2008; Dinardo et al., 2014). Většina autorů přímo přisuzovala rozdíly v mechanickém chování aortální stěny k různému obsahu elastinu v tunica media. Například Guo a Kassab (2004) pozorovali nižší poměr napínání a Cauchyova stresu v prasečí hrudní aortě a Roach a Song (1994) pozorovali, že dolní břišní aorta se roztrhla při nižším zatížení na počátku, ale k disekci aorty bylo potřeba mnohem vyšší energie (Roach and Song, 1994). Dinard et al. (2014) pozoroval vyšší tuhost v břišní aortě v důsledku sníženého obsahu elastinu. Kromě mechanické funkce elastinu v aortální stěně může být tento protein důležitý v průběhu šíření zánětlivých změn, protože Lannoy et al. (2014) pozoroval, že elastin společně s fibrillinem působí jako autokrinní faktor, který reguluje aktivitu a dostupnost transformujícího růstového faktoru ve tkáni (Lannoy et al., 2014). Je zajímavé, že nižší podíl elastinu ve vzestupné aortě a aortálním oblouku v naší studii nebyl v žádné jiné studii zmíněn, přestože jsou známy poruchy, jako jsou výdutě hrudní aorty, které jsou oslabeny právě v proximálních oblastech aorty (Kuzmik et al., 2012). Kombinace vysokého krevního tlaku v proximálních segmentech aorty a poněkud menší hladiny elastinu v tunica media by mohly vést ke snížení odolnosti této oblasti kardiovaskulárního systému. Vzestupná aorta se liší od aortálního oblouku a sestupné hrudní a břišní aorty v obsahu elastinu a fenotypu buněk hladkého svalstva. Ko et al. (2001) našel převážně populaci buněk pozitivních na desmin a negativních na konexin 43 v aortálním oblouku a sestupné aortě potkanů, stejně jako převážně desmin

pozitivních a konexin 43 negativních populací hladkých svalových buněk v břišní aortě. Hladké svalové buňky pozitivní na desmin a konexin 43 byly omezeny na vzestupnou aortu u potkanů (Ko et al., 2001). V naší studii nebyla studována exprese konexinů hladkými svalovými buňkami. Avšak i v prasečí aortě byla v tunica media vzestupné aorty vyšší míra desminu ve srovnání s aortálním obloukem (s trendem v sestupné hrudní aortě). Obecně platí, že naše výsledky potvrdily vyšší relativní hladinu hladkých svalových buněk pozitivních na aktin v břišní aortě ve srovnání se segmenty hrudní aorty (Tonar et al., 2015a). Tato data podporují výsledky Arnauda (2000), který uvedl vyšší metabolickou aktivitu a výslednou sníženou toleranci proti kryoprezervaci v distálních segmentech segmentu aorty (Arnaud, 2000). Informace o rozšíření fenotypů hladkých svalových buněk v aortě a cévním stromu nám mohou pomoci pochopit vývoj atherosklerózy a jejích slabých míst, protože (alespoň u lidí) hladké svalové buňky se syntetickým fenotypem se mohou šířit a produkovat mezibuněčnou hmotu, hrající důležitou roli v postupu tohoto onemocnění (Rao et al., 2000).

6.1.2 Podíl elastinu a kolagenu zůstal konstantní u odstavených selat, ale podíl aktinu zůstal konstantní během růstu u výkrmových prasat

U selat do 75. dne stáří nebylo zvětšení tloušťky stěny (obr. 13F) doprovázeno významnými změnami v podílu elastinu a kolagenu. Výsledky naznačují, že tvorba elastinu a kolagenu pokračuje u selat po narození a u odstavených selat úměrně k zesílení aortální stěny, což odpovídá vysokému podílu buněk odvozených z mezenchymu pozitivních na vimentin, které produkují vlákna mezibuněčné hmoty. U výkrmových prasat starších 180 dní se podíl elastinu snížil a kolagenu zvýšil (obr.15A-B). To by mohlo být způsobeno nižší rychlostí syntézy elastinu během stárnutí a metaloproteázami nebo fibrinolytickými faktory ovlivňujícími přestavbu aortální stěny (Kříková et al., 2009). Je zajímavé, že podíl aktinu nebyl věkem ovlivněn (Tonar et al. 2015a).

6.1.3 Silnější segmenty aorty mají vyšší podíl elastinu a kolagenu a nižší podíl kontraktilních buněk

Tloušťka aorty závisí současně na dvou proměnných, zvyšuje se s věkem (obr. 13F), ale snižuje se v proximodistálním směru (obr. 1 2F). Korelační analýza mezi elastinem a znaky hladkých svalových buněk ukázala, že zvýšená tloušťka stěny proximálních segmentů aorty korelovala s vyšším podílem elastinu a kolagenu a s nižším podílem aktinu, desminu a vimentinu. Celkový podíl desminu byl nižší než vimentinu, což je v souladu s původními nálezy Franka and Warrena (1981), kteří uvedli, že vimentinová intermediální vlákna převažují nad desminovými vlákny v aortálních hladkých svalových buňkách (Tonar et al., 2015).

6.1.4 Význam studie

Znalost segmentové a věkové variability prasečí aorty je užitečná při plánování experimentů s hrudní a břišní aortou a odhadu počtu potřebných zvířat. Vzhledem k rychlému růstu selat bude přínosem pro experimenty s rostoucím prasečím modelem, ve kterém je růst stěny tepny součástí experimentálního návrhu, jako jsou pokusy s rekonstrukcí aorty a nahrazením aorty (Cheng et al., 2001; Ioannou et al., 2003) a tepenné bandáže napodobující paliativní operaci plicnice novorozenců s vrozenými srdečními vadami (Nedorost et al., 2013). Údaje o složení aortální stěny z naší studie byly použity pro korelaci s hustotou vasa vasorum. Z výsledků vyplývá, větší hustota vasa vasorum v tunica media koreluje s větší tloušťkou tunica media a větším podílem elastinu (Tonar et al., 2016). Dále byly výsledky použity pro sledování korelace s orientací hladkých svalových vláken v tunica media prasečí aorty (Tonar et al., 2017). Nedostatek kvantitativních rozdílů v kompozici stěn mezi suprarenální a infrarenální břišní aortou v naší studii poskytuje zajímavé informace o vývoji chirurgických přístupů. Infrarenální břišní aorta je podstatně snadněji posuzována a může tedy sloužit jako ekvivalentní model pro suprarenální aortu s podobným histologickým složením. Při modelování jiných oblastí aorty je třeba při interpretaci výsledků pečlivě zvážit rozdíly ve složení aortální stěny (Tonar et al., 2015a).

Data z této studie mohou být použity v biomechanických modelech prasečí aorty založené na histologických nálezech (Sokolis, 2010; Horný et al., 2014a, 2014b) nebo k lepšímu pochopení mechanického selhání při disekci aorty (Krüger et al., 2016; Witzenburg et al., 2017). Modelování biomechaniky prasečí aorty se značně překrývají s modely lidské aorty (Holzapfel and Ogden, 2010; Humphrey and Holzapfel, 2012; Schriefl et al., 2012; Wilson et al., 2012), v tomto ohledu využil naše nálezy Sokolis et al. (2017). K tomuto účelu může být růst aortální stěny popsán pomocí růstových křivek podle Gielecki et al. (2006) nebo Szpinda (2007).

6.1.5 Metodická omezení studie

Měření tloušťky stěny bylo ovlivněno vyříznutím aorty a postmortální kontrakcí cévních segmentů. Bylo však vyvinuto úsilí manipulovat se všemi vzorky aorty stejným způsobem, aby se zachovala přirozená vnější hranice stěny aorty. Neprovedli jsme žádnou korekci smrštění tkání. Nenašli jsme však téměř žádné mikrotrhliny v tunica media a žádné mezery mezi složkami. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly smrštění mezi elastinem, kolagenem, hladkými svalovými buňkami a dalšími složkami mezibuněčné hmoty během fixace, zalévání do parafinu nebo krájení. Proto s největší pravděpodobností nebylo zkresleno hodnocení plošných podílů jednotlivých složek. Uvádíme data jako střední hodnoty pro tunica media, aniž bychom popsali radiální rozdíly v tunica media. Posouzení rozdílu mezi elastickými lamelárními jednotkami by vyžadovalo perfúzní fixaci, aby se vyloučilo jakákoli zkreslení vyvolané posmrtnou kontrakcí. Kromě toho přítomnost vasa vasorum v tunica media mohla být zdrojem zkreslení, protože je negativní na elastin, ale pozitivní na α -hladkosvalový aktin, desmin a vimentin. Naše studie neodlišovala vzorky od dorzální, laterální a ventrální strany břišní aorty. Dalším omezením je to, že odhady byly vždy založeny na jednom řezu na barvicí metodu a anatomickou polohu. Vzhledem k počtu zvířat jsme neprováděli souběžnou statistiku se seskupením vzorků podle aortálních segmentů a věku (Tonar et al., 2015a).

6.2 Orientace hladkých svalových buněk v tunica media aorty prasete

Byly nalezeny statistické souvislosti mezi proměnlivostí orientace hladkých svalových buněk a složením tunica media podle segmentů aorty u prasat. Ve vzorcích s větším podílem kontraktibilních hladkých svalových buněk a menším podílem elastinu byly symetrické šroubovice hladkých svalových buněk těsně navzájem uspořádány a byly více soustředěné než ve vzorcích s větším podílem elastinu a s menším podílem hladkých svalových buněk, které byly méně pozitivní na aktin a desmin. Tyto nálezy jsou vhodné pro biomechanické modelování prasečí aorty založené na struktuře (Horný et al., 2014b; Polzer et al., 2015) za normálních podmínek (Tonar et al., 2017).

6.3 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice

Naše výsledky ukázaly, že kalcifikace negativně korelovala s mezní deformací u aort, tzn., že deformace aortální tkáně byla snížena kalcifikací. To je v souladu se zjištěním Niederhoffer et al. (1997), že kalcifikace aorty zvyšuje její tuhost. Přítomnost kalcifikace vedla k vzniku lokálního napětí a ruptury v těchto oblastech (Marra et al., 2006; Li et al., 2008). V naší studii jsme neviděli více kalcifikace kolem trhlin než v jiných částech vzorku. Avšak štěpy aorty a plicnice jsou makroskopicky vyšetřeny kardiochirurgem v době procedury odebrání štěpu před jeho kryoprezervací. Pokud jsou nalezeny léze s kalcifikací, není alotransplantát zařazen do tkáňové banky. Proto jsme pozorovali pouze malé oblasti s kalcifikací (obr. 1F) v tunica media aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a).

Výsledky histologické kvantifikace ukázaly, že základními složkami stěny aorty a plicnice jsou elastin a kolagen. Nelineární chování komponent vzorků lze vysvětlit mechanickými vlastnostmi, konstrukčním složením a propojením kolagenu a elastinu. Kolagen je zvlněný, což přispívá k mechanickým vlastnostem tkáně pouze při vyšších hodnotách deformace po jeho narovnání ve směru zatížení. V počáteční fázi zatížení ovlivňuje kolagen pouze nepatrně modul pružnosti tkáně. Hlavní úlohu při malých deformacích hraje elastin s malým Youngovým modulem pružnosti (0,6 MPa v ligamentum nuchae) (Vincent, 1990). Kolagenová vlákna mají po natažení vysoký Youngův modul

pružnosti (1-2,5 GPa pro kolagen ve šlaše potkana) (Meyers et al., 2008) a začnou přispívat k celkové mechanické odezvě tkáně (Kubíková et al., 2017a).

V současné době se používají pouze kryokonzervované alotransplantáty lidských cév a chlopní, které byly uchovávány zamražené po dobu kratší než pět let. Toto je založeno na zvyklosti tkáňových bank a stávajících výsledcích studie pětiletých kryoprezervovaných vzorků (Goffin et al., 1996). Bohužel neexistují žádné studie porovnávající mechanické vlastnosti a histologické složení těchto vzorků s těmi, které byly uchovávány po dobu delší dobu (Kubíková et al., 2017a). Proces kryoprezervace a následné rozmražení štěpů před použitím způsobuje ztrátu endotelu na povrchu stěny aorty (Novotny et al., 2017).

V této studii bylo několik omezení. Některé parametry (například tloušťka stěny) mohou být ovlivněny malými rozdíly v orientaci při zalévání vzorků do parafínu. Navíc naše studie zahrnovala pouze jednoosé zatížení. Je známo, že dvouosé zatížení poskytuje komplexnější náhled na mechanické chování kardiovaskulárních vzorků (Metzler et al., 2012), ale zvolili jsme jednoosé zatížení a Youngův modul pružnosti ve dvou lineárních oblastech, konkrétně v oblasti malých deformací a oblasti velkých deformací, abychom získali jednoduchou a fyzikálně významnou charakteristiku pasivního mechanického chování kořenů aorty a plicnice. Tato vlastnost může být snadno použita pro porovnání různých skupin alogenních štěpů (Kubíková et al., 2017a).

6.4 Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aortální a pulmonální chlopně

Výsledky histologické kvantifikace ukázaly, že stejně jako u aorty a plicnice, hlavními složkami cípů chlopní jsou elastin a kolagen. Zapojení elastinu a kolagenu při odpovědi tkáně na zatížení v oblasti malých a velkých deformací je popsáno výše. Rozložení elastických vláken není závislé na pohlaví, ale je odlišné v jednotlivých vrstvách cípů chlopní (Otto et al., 2006), my jsme hodnotili plošný podíl elastinu v celé stěně cípů (Kubíková et al., 2017a).

U ovcí byla zkoumána funkce štěpů kryoprezervovaných mitrálních chlopní po implantaci místo trikuspidální chlopně. Mechanická kvalita štěpů byla podle chirurga velmi dobrá (Vojáček et al., 2006). Proto v další studii implantovali ovcím kryoprezervované lidské štěpy mitrální chlopně a hodnotili mechanické vlastnosti. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v hodnocených parametrech, kryokonzervace tedy významně neovlivňuje mechanické vlastnosti tkáně (Hlubocký et al., 2011). Tato studie však postrádala morfologické hodnocení (Kubíková et al., 2017a). Stejně jako endotel cév je i endotel pokrývající povrch cípů chlopní poškozen kryoprezervací (Burkert et al., 2008). Bylo provedeno také mnoho studií se srdečními chlopněmi prasete (Vesely, 1998; Balaoing et al., 2014). Studie Martina a Suna (2012) naznačují, že jednoletý model ovce a 6- až 9měsíční model prasete nemusí být dostatečně reprezentativní pro typické stárnutí lidské tkáně. Stárnoucí lidské aortální chlopně jsou tužší a mají odlišnou histologickou strukturu než sledované zvířecí modely (Kubíková et al., 2017a). Tyto zvířecí modely by měly být používány s opatrností v budoucích studiích (Martin and Sun, 2012).

V současné době se používají pouze kryokonzervované aloštěpy lidských chlopní, které byly kryoprezervovány po dobu kratší než pět let stejně jako je tomu u štěpů kořene aorty a plicnice. To je založeno jen na zvyklostech tkáňových bank. Prozatím neexistují studie srovnávající mechanické vlastnosti a histologické složení chlopní mražených méně a více než 5 let. Proto by měly být provedeny další studie na použitelnost těchto štěpů (Kubíková et al., 2017a).

Naše výsledky mohou být použity pro výpočetní modelování mechaniky srdečních chlopní (Prot et al., 2010) nebo k optimalizaci složení umělých chlopní, které se snaží co nejvíce napodobit skutečné vzorky (Kubíková et al., 2017a).

Stejná omezení, jaká byla u hodnocení mechanických vlastností a složení aorty v naší přechozí studii, se vyskytovala i při analýze cípů aortální a pulmonální chlopně (Kubíková et al., 2017a).

6.5 Šíření experimentálně navozené trhliny v aortě a plicnici

Teoretická hustota průsečíků elastických vláken spolu s profilem experimentálně vytvořené trhliny aorty a plicnice byla větší než skutečná hustota průsečíků ($p < 0,001$). Trhlina se šířila mimo elastická vlákna, tzn., že elastická vlákna jsou i po kryoprezervaci hodnotnou složkou stěny aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a).

6.6 Poškození stěny renální tepny ovce při radiofrekvenční ablací autonomních nervů

Multicentrická studie PRAGUE-15 srovnávala vliv renální denervace a spironolaktonu (diuretika) na snížení krevního tlaku po jednom roce a dvou letech. Po roce mělo přidání spironolaktonu významně lepší účinek na snížení krevního tlaku než při renální denervaci. Po dvou letech se zdál být spironolakton stále účinnější, ale rozdíl už nebyl statisticky významný (Rosa, 2017). Z výsledků současných studií stále není zcela zřejmý mechanismus účinku renální denervace. Abychom rozšířili poznatky získané v předchozích preklinických studiích (Booth et al., 2015; Gan et al., 2015; Sakakura et al., 2015; Mahfoud et al., 2016), zaměřili jsme se na zkoumání účinků jednobodového a vícebodového katetru po 48 hodinách od ablace autonomních pletení doprovázející renální tepnu. Tato počáteční fáze denervace, respektive bezpečnost použití a vliv na mikroskopickou stavbu renální tepny a autonomních pletení, nebyla dosud zkoumána (Táborský et al., 2017).

Hlavním zjištěním při histologickém hodnocení poškození stěny renální tepny a přidružených nervů bylo, že postup denervace pomocí vícebodového ablačního katetru vedl k výrazně vyššímu výskytu vaskulárního a perivaskulárního poškození, nejspíše vlivem dobré účinnosti tohoto postupu. Nicméně žádná varianta denervace nedosáhla úplného poškození cílových renálních nervových pletení, pravděpodobně kvůli anatomické variabilitě stěny renální tepny a variabilnímu rozdělení periarteriální nervové pleteně u ovcí (Táborský et al., 2017).

Přestože jsme si vědomi hrubých anatomických a morfologických rozdílů mezi příslušnými strukturami u ovcí a lidí, studie modelu ovcí se zdají být klinicky relevantní.

Kromě rozdílné anatomické lokalizace levé ledviny u ovcí jsme zaznamenali také rozdíly v tloušťce tunica media renální tepny. Histologická morfometrická analýza ukázala, že tloušťka renální tepny u člověka významně souvisí s věkem a jak intima, tak i media podstupují hyperplazii s věkem (Reddy et al., 2011). Dalším problémem je to, že u lidí je distribuce periarteriálního nervu s ohledem na hustotu, velikost a vzdálenost od průsvitu různá podél délky renální tepny (Sakakura et al., 2014). Zjistili jsme, že u ovcí se vzdálenost periarteriálního renálního nervu od průsvitu renální tepny pohybovala od 1 do 3 mm. Celkově takové individuální variability mohou zřejmě ovlivnit účinnost postupu denervace zaměřeného na renální denervaci a tato studie poskytuje další důkaz, že rozsah poškození nervové struktury během denervace závisí na vzdálenosti od místa ablace (Táborský et al., 2017). Toto pozorování může pomoci vysvětlit omezené antihypertenzní účinky denervace a může být také relevantní pro proces následné progresivní regenerace (Booth et al., 2015; Sakakura et al., 2015).

Porovnání morfologických účinků použití jednobodových a vícebodových ablačních katetrů silně naznačuje, že zvýšení počtu ablačních míst zvyšuje pravděpodobnost vzniku poškození nervů kolem renální tepny (Tzafriri et al., 2014; Tsioufis et al., 2015; Rosa et al., 2016). Je pravda, že důkazy o dlouhodobých vynikajících účincích vícebodového systému při denervaci jsou stále omezené (Tsioufis et al., 2015; Rosa et al., 2016). V této studii anatomická variabilita distribuce renálních nervů u ovcí neumožnila úplné nebo velké narušení renálního nervového svazku. Proto lze předpokládat, že účinnost jakéhokoli systému denervace je silně ovlivněna specifickou anatomickou distribucí renálních nervů a také tkáňovou vodivostí určující přechod energie z ablačního místa na periarteriální nervovou pletěň (Sakakura et al., 2014). Navíc nervové pleteně obklopující renální tepnu mají značnou anatomickou interindividuální variabilitu, pokud jde o rozdílný počet nervů, různou prostorovou distribuci jejich větvení a anastomóz a variabilní vzdálenost od renální tepny (Reddy et al., 2011). Proto se zdá, že histologický skórovací systém hodnocení je nejvhodnější pro posouzení dopadu renální denervace (Tzafriri et al., 2014). Náš modifikovaný skórovací systém používaný v této studii byl zaměřen na podrobné vyhodnocení variabilních mikroskopických změn stěny renální tepny a nervové mikrostruktury po akutní denervaci. Ačkoli jsme pozorovali, že vícebodový postup ablace vedl k většímu poškození renálních nervů ve srovnání s jednobodovou ablací, naše

histologická analýza nervových pletení doprovázející renální tepnu ukázala stále neúplnou efektivitu obou systémů při denervaci (Táborský et al., 2017).

Omezením této studie je, že histologické zpracování vzorků tkáně mohlo způsobit poškození endotelu, a proto může být hodnota bodování intravaskulárních změn nejistá (Táborský et al., 2017).

6.7 Porovnání složení a buněčné osídlení cévních náhrad po implantaci

Oba typy testovaných štěpů byly po deseti dnech částečně a po šesti měsících zcela pokryty endotelem, který zabraňuje tvorbě trombů (Zilla et al., 1993). Po šesti měsících od implantace byly u obou typů štěpů patrné známky pravidelných vrstev aorty s koncentrickými vrstvami elastinu, vaskulárními hladkými svalovými buňkami a kolagenem, čímž připomínaly typické uspořádání elastických artérií (Shadwick, 1999)

Zdálo se, že štěpy byly dobře snášeny a nebyly zjištěny žádné závažné nežádoucí účinky s výjimkou dvou případů metaplazie v chrupavku, které byly v oblasti napojení štěpu na aortu. To může být považováno za znamení lokálních degenerativních změn způsobených tkáňovou dystrofií (Qiao et al., 1995).

Vnitřní třetina štěpu obohaceného oxidem dusnatým byla buňkami nejhustěji prostoupená vrstva. Mezi střední a vnější vrstvou nebyly žádné rozdíly v buněčné infiltraci. V náhradách bez oxidu dusnatého nebyly nalezeny žádné rozdíly v prostoupení buňkami mezi vrstvami štěpu.

Tloušťka stěny štěpu byla silnější než myší aorta, kam byl štěp implantován. Navíc typ tepny (elastická) neodpovídal zamýšlenému použití, tj. malopřůměrová náhrada, která by se měla implantovat místo svalového svalového typu. U dalších experimentů by mohl být využit větší zvířecí model, jako je prase (Leitão et al., 2016) nebo ovce (Valencia Rivero et al., 2017), kde jsou dostupné cévy svalového typu se středním a malým průměrem, které by byly obdobné lidským.

7 Závěry práce

Studie zodpověděla otázky formulované v kapitole 3 následujícím způsobem:

Pro plánování chirurgických experimentů jsme posoudili rozdílné kvantitativní složení prasečí aorty v pěti segmentech. Při porovnání hrudní vzestupné aorty a břišní suprarenální aorty jsme našli význačné rozdíly v zastoupení všech hodnocených složek, tj. elastinu, kolagenu, aktinu, desminu i vimentinu. Nenašli jsme žádné rozdíly ve složení suprarenální a infrarenální břišní aorty a mimo rozdílu v zastoupení vimentinu je složení vzestupné hrudní aorty stejné jako v případě oblouku aorty. Přesná znalost těchto rozdílů při plánování experimentů umožňuje zvolit nejvhodnější segment pro studii, vzájemnou porovnatelnost výsledků, analýzu síly testu a odhadu počtu vzorků pro dosažení požadované úrovně přesnosti.

Ve stěně aorty prasete jsme zjistili, že statistické rozdělení orientací dvou symetrických šroubovic hladkých svalových buněk medie souvisí s lokálními změnami zastoupení kontraktilního fenotypu těchto buněk a rovněž se změnami zastoupení kolagenu a elastinu. Tato data jsou vhodná pro biomechanické modelování založené na mikrostruktuře.

Histologická analýza kryoprezervovaných štěpů aorty a plicnice po biomechanickém měření ukázala, že elastin omezuje šíření trhlin jejich stěnou. Dále jsme zjistili, že čím větší tloušťka intima-media, tím větší měli vzorky mezní deformaci a Youngův modul pružnosti v oblasti velkých deformací. Navržená kvantitativní histologická analýza je vhodná k charakterizaci kryoprezervovaných štěpů aorty, plicnice a jejich chlopní. Samotné histologické složení nevysvětluje mechanické vlastnosti těchto náhrad, proto by měly být při hodnocení vlivu dlouhodobé kryoprezervace na vlastnosti štěpů použity jak morfologické, tak biomechanické testy.

U ovčího modelu jsme popsali rozsah a intenzitu poškození tepenné stěny a jejího okolí při použití dvou typů katetrů testovaných pro radiofrekvenční ablaci endovaskulární cestou. Koncept skórovacího systému použitého v naší studii umožňuje zhodnotit poškození nervových pletení doprovázejících renální tepnu a taktéž stěnu samotné tepny po ošetření katetrem při denervaci.

Přístup kvantitativní histologie poskytuje možnost posoudit biomateriály při *in vivo* experimentech. Prokázali jsme, že vhodně vytvarované nanovlákné nosiče mohou u myši plnit po dobu 6 měsíců úlohu aorty, přičemž dochází k jejich postupné endotelizaci, k osídlení buňkami, ke vzniku rozvrstvení obdobnému intimě a medii skutečných elastických tepen, dále k diferenciaci buněk s kontraktilem fenotypem, k tvorbě a zrání kolagenu I a v některých případech i k tvorbě elastických lamel, to vše při poměrně dobré snášenlivosti a jen omezené zánětlivé reakci příjemce štěpu.

V předložené dizertační práci jsme testovali metody kvantitativní histologie na velmi rozmanitém spektru převážně experimentálně chirurgických studií. Kromě vlastních výsledků jednotlivých studií je v části věnované metodice obsažena řada praktických postupů a doporučení s ohledem na způsoby víceúrovňového vzorkování při odběru a hodnocení materiálu, volbu barvicích metod a volbu mikroskopického zvětšení vhodného pro řešení konkrétních otázek. Na základě studií, které jsou přiloženy k dizertaci, lze shrnout, že klasické histologické postupy podávají jen částečnou informaci o trojrozměrné stavbě skutečných cév a obvykle ve světle současné úrovně poznání nepostačují samy o sobě k vysvětlení mechanismů funkční adaptace cévní stěny za různých podmínek. Ani při použití kombinací řady histologických barvicích metod není dosud znám způsob, jak přímočaře extrapolovat informace ze strukturálního mikroskopického obrazu do oblasti mechanických vlastností cévní stěny a naopak.

Tato omezení potvrzují i dosavadní praxi v tom smyslu, že pro komplexní posouzení funkce aorty, plicnice a dalších velkých tepen jsou kromě histologických vyšetření zapotřebí i paralelní vyšetřování metodami biomechaniky, popřípadě biochemie a buněčné biologie. Naopak za hlavní doménu histologických postupů při studiu cévní stěny považujeme kvalitativní i kvantitativní popis mikroskopického složení přibližně v měřítku jednotek až tisíců mikrometrů, charakteristiku buněčných fenotypů, popis přestavby (remodelace) cévní stěny za různých podmínek a v neposlední řadě i popis rozmístění a prostorových vztahů mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou. Při vhodné orientaci histologických řezů zůstává pozice mikroskopických struktur přístupná mikroskopickému vyšetření, což je přetrvávající výhoda histologického vyšetření oproti technikám homogenizovaných tkáňových vzorků využívaných v biochemii a molekulární biologii. Za velmi perspektivní způsob odečítání kvantitativních dat z mikroskopických obrazů

Závěry práce

považujeme stereologické postupy založené na aplikaci geometrických sond na mikroskopické obrazy. Tyto metody se v našich studiích plně osvědčily, jeví značnou odolnost vůči drobným technickým chybám rutinních a archivních preparátů a při správném použití v souladu s designem dané metody poskytují vzorků libovolné povahy nevychýlená data, která je možné testovat standardními statistickými metodami.

8 Literatura

- Aguirre-Sanceledonio, M., Fossum, T.W., Miller, M.W., Humphrey, J.D., Berridge, B.R., Herráez, P., 2003. Collateral Circulation in Experimental Coarctation of the Aorta in Minipigs: a Possible Association with Hypertrophied Vasa Vasorum. *Journal of Comparative Pathology* 128, 165–171. doi:10.1053/jcpa.2002.0621
- Ahanchi, S.S., Tsihlis, N.D., Kibbe, M.R., 2007. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *Journal of Vascular Surgery* 45, A64–A73. doi:10.1016/j.jvs.2007.02.027
- Angouras, D.C., Dosios, T.J., Dimitriou, C.A., Chamogeorgakis, T.P., Rokkas, C.K., Manos, T.A., Sokolis, D.P., 2012. Surgical thoracic sympathectomy induces structural and biomechanical remodeling of the thoracic aorta in a porcine model. *J. Surg. Res.* 172, 68–76. doi:10.1016/j.jss.2010.07.039
- Arabkhani, B., Mookhoek, A., Di Centa, I., Lansac, E., Bekkers, J.A., De Lind Van Wijngaarden, R., Bogers, A.J.J.C., Takkenberg, J.J.M., 2015. Reported Outcome After Valve-Sparing Aortic Root Replacement for Aortic Root Aneurysm: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Thorac. Surg.* 100, 1126–1131. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.05.093
- Arnaud, F., 2000. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation. *J. Surg. Res.* 89, 147–154. doi:10.1006/jsre.2000.5816
- Avanzini, A., Battini, D., Bagozzi, L., Bisleri, G., 2014. Biomechanical evaluation of ascending aortic aneurysms. *Biomed Res Int* 2014, 820385. doi:10.1155/2014/820385
- Azadani, A.N., Chitsaz, S., Matthews, P.B., Jaussaud, N., Leung, J., Wisneski, A., Ge, L., Tseng, E.E., 2012. Biomechanical comparison of human pulmonary and aortic roots. *Eur J Cardiothorac Surg* 41, 1111–1116. doi:10.1093/ejcts/ezr163
- Balaoing, L.R., Post, A.D., Liu, H., Minn, K.T., Grande-Allen, K.J., 2014. Age-related changes in aortic valve hemostatic protein regulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 72–80. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301936
- Bashey, R.I., Torii, S., Angrist, A., 1967. Age-related collagen and elastin content of human heart valves. *J Gerontol* 22, 203–208.
- Beenakker, J.-W.M., Ashcroft, B.A., Lindeman, J.H.N., Oosterkamp, T.H., 2012. Mechanical properties of the extracellular matrix of the aorta studied by enzymatic treatments. *Biophys. J.* 102, 1731–1737. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.041
- Berillis, P., 2013. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *The Open Circulation and Vascular Journal* 6, 1–8. doi:10.2174/1877382601306010001
- Bhatt, D.L., Kandzari, D.E., O'Neill, W.W., D'Agostino, R., Flack, J.M., Katzen, B.T., Leon, M.B., Liu, M., Mauri, L., Negoita, M., Cohen, S.A., Oparil, S., Rocha-Singh, K., Townsend, R.R., Bakris, G.L., SYMPLICITY HTN-3 Investigators, 2014. A

Literatura

- controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N. Engl. J. Med.* 370, 1393–1401. doi:10.1056/NEJMoa1402670
- Booth, L.C., Nishi, E.E., Yao, S.T., Ramchandra, R., Lambert, G.W., Schlaich, M.P., May, C.N., 2015. Reinnervation of renal afferent and efferent nerves at 5.5 and 11 months after catheter-based radiofrequency renal denervation in sheep. *Hypertension* 65, 393–400. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04176
- Braunwald, E., Bonow, R.O. (Eds.), 2012. *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, 9th ed. ed. Saunders, Philadelphia.
- Braverman, A.C., Güven, H., Beardslee, M.A., Makan, M., Kates, A.M., Moon, M.R., 2005. The bicuspid aortic valve. *Curr Probl Cardiol* 30, 470–522. doi:10.1016/j.cpcardiol.2005.06.002
- Brtko, M., Vojáček, J., Tuna, M., Telekes, P., 2011. Bikuspidální aortální chlopeč - etiopatogeneze a přirozený vývoj. *Vnitř Lék* 2011, 176–182.
- Buchanan, R.M., Sacks, M.S., 2014. Interlayer micromechanics of the aortic heart valve leaflet. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 13, 813–826. doi:10.1007/s10237-013-0536-6
- Burkert, J., Krs, O., Vojáček, J., Mokráček, A., Slízová, D., Hlubocký, J., Kobylka, P., Spatenka, J., 2008. Cryopreserved semilunar heart valve allografts: leaflet surface damage in scanning electron microscopy. *Zentralbl Chir* 133, 367–373. doi:10.1055/s-2008-1076872
- Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Bondjers, G., 1998. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139, 205–222.
- Cattell, M.A., Anderson, J.C., Hasleton, P.S., 1996. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clinica Chimica Acta* 245, 73–84. doi:10.1016/0009-8981(95)06174-6
- Cheng, H.D., Jiang, X.H., Sun, Y., Wang, J., 2001. Color image segmentation: advances and prospects. *Pattern Recognition* 34, 2259–2281. doi:10.1016/S0031-3203(00)00149-7
- Chow, M.-J., Mondonedo, J.R., Johnson, V.M., Zhang, Y., 2013. Progressive structural and biomechanical changes in elastin degraded aorta. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 12, 361–372. doi:10.1007/s10237-012-0404-9
- Clark, J.M., Glagov, S., 1985. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* 5, 19–34.
- Da Costa, P.E., 1990. *Robbins' pathologic basis of disease*. R. S. Cotran, V. Kumar and S. L. Robbins. W. B. Saunders, Philadelphia, 1989. No. of pages: 1519. Price £37. ISBN:0 7216 2302 6. *The Journal of Pathology* 160, 89–89. doi:10.1002/path.1711600125
- Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E., Iozzo, R.V., 1997. Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology

Literatura

- and Skin Fragility. *The Journal of Cell Biology* 136, 729–743.
doi:10.1083/jcb.136.3.729
- Dao, H.H., Essalihi, R., Bouvet, C., Moreau, P., 2005. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc. Res.* 66, 307–317. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.012
- de Valence, S., Tille, J.-C., Mugnai, D., Mrowczynski, W., Gurny, R., Möller, M., Walpoth, B.H., 2012. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials* 33, 38–47.
doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.024
- Dinardo, C.L., Venturini, G., Zhou, E.H., Watanabe, I.S., Campos, L.C.G., Dariolli, R., da Motta-Leal-Filho, J.M., Carvalho, V.M., Cardozo, K.H.M., Krieger, J.E., Alencar, A.M., Pereira, A.C., 2014. Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H505-516. doi:10.1152/ajpheart.00655.2013
- Eberlová, L., Tonar, Z., Witter, K., Křížková, V., Nedorost, L., Korabečná, M., Tolinger, P., Kočová, J., Boudová, L., Třeška, V., Houdek, K., Moláček, J., Vrzalová, J., Pešta, M., Topolčan, O., Valenta, J., 2013. Asymptomatic abdominal aortic aneurysms show histological signs of progression: a quantitative histochemical analysis. *Pathobiology* 80, 11–23. doi:10.1159/000339304
- Fischer, J.W., 2004. Decorin Promotes Aortic Smooth Muscle Cell Calcification and Colocalizes to Calcified Regions in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 2391–2396.
doi:10.1161/01.ATV.0000147029.63303.28
- Flues, K., Moraes-Silva, I.C., Mostarda, C., Souza, P.R.M., Diniz, G.P., Moreira, E.D., Piratello, A.C., Chaves, M.L.B., De Angelis, K., Salemi, V.M.C., Irigoyen, M.C., Caldini, E.G., 2012. Cardiac and pulmonary arterial remodeling after sinoaortic denervation in normotensive rats. *Autonomic Neuroscience* 166, 47–53.
doi:10.1016/j.autneu.2011.10.005
- Fornieri, C., Taparelli, F., Quaglino, D., Contri, M.B., Davidson, J.M., Algeri, S., Ronchetti, I.P., 1999. The effect of caloric restriction on the aortic tissue of aging rats. *Connect. Tissue Res.* 40, 131–143.
- Frank, E.D., Warren, L., 1981. Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3020–3024.
- Fung, Y.C., 1993. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*, 2nd ed. ed. Springer-Verlag, New York.
- Gan, Q., Qu, X.-K., Gong, K.-Z., Guan, S.-F., Han, W.-Z., Dai, J.-J., Li, R.-G., Zhang, M., Liu, H., Xu, Y.-J., Zhang, Y.-J., Fang, W.-Y., 2015. Efficacy and safety of a novel multi-electrode radiofrequency ablation catheter for renal sympathetic denervation in pigs. *J Geriatr Cardiol* 12, 618–625. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.06.006
- Gandalovičová, J., 2001. Genetika a kardiologie na prahu nového tisíciletí. *Interní medicína pro praxi* 2001, 579–582.

Literatura

- Gao, F., Chia, K.-S., Krantz, I., Nordin, P., Machin, D., 2006. On the application of the von Mises distribution and angular regression methods to investigate the seasonality of disease onset. *Stat Med* 25, 1593–1618. doi:10.1002/sim.2463
- Gauthier-Bastien, A., Ung, R.-V., Larivière, R., Mac-Way, F., Lebel, M., Agharazii, M., 2014. Vascular remodeling and media calcification increases arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clin. Exp. Hypertens.* 36, 173–180. doi:10.3109/10641963.2013.804541
- Gielecki, J.S., Syc, B., Wilk, R., Musiał-Kopiejka, M., Piwowarczyk-Nowak, A., 2006. Quantitative evaluation of aortic arch development using digital-image analysis. *Ann. Anat.* 188, 19–23. doi:10.1016/j.aanat.2005.04.013
- Goffin, Y., Grandmougin, D., Van Hoeck, B., 1996. Banking cryopreserved heart valves in Europe: assessment of a 5-year operation in an international tissue bank in Brussels. *Eur J Cardiothorac Surg* 10, 505–512.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147, 229–263.
- Guo, X., Kassab, G.S., 2004. Distribution of stress and strain along the porcine aorta and coronary arterial tree. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H2361-2368. doi:10.1152/ajpheart.01079.2003
- Hájek, Z., Macek, M., Kulovaný, E., 2000. *Základy prenatalní diagnostiky*. Grada, Praha.
- Hedin, U., Bottger, B.A., Forsberg, E., Johansson, S., Thyberg, J., 1988. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 107, 307–319.
- Henegar, J.R., Zhang, Y., De Rama, R., Hata, C., Hall, M.E., Hall, J.E., 2014. Catheter-based radiofrequency renal denervation lowers blood pressure in obese hypertensive dogs. *Am. J. Hypertens.* 27, 1285–1292. doi:10.1093/ajh/hpu048
- Hinton, R.B., Yutzey, K.E., 2011. Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annual Review of Physiology* 73, 29–46. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142145
- Hlubocký, J., Mokráček, A., Nováček, V., Vojáček, J., Burkert, J., Kochová, P., Klepáček, J., Pepper, J., Spatenka, J., 2011. Mechanical properties of mitral allografts are not reasonably influenced by cryopreservation in sheep model. *Physiol Res* 60, 475–482.
- Holmes, L.B., 2012. *Common malformations*. Oxford University Press, Oxford.
- Holzapfel, G.A., 2006. Determination of material models for arterial walls from uniaxial extension tests and histological structure. *J. Theor. Biol.* 238, 290–302. doi:10.1016/j.jtbi.2005.05.006
- Holzapfel, G.A., Ogden, R.W., 2010. Modelling the layer-specific three-dimensional residual stresses in arteries, with an application to the human aorta. *J R Soc Interface* 7, 787–799. doi:10.1098/rsif.2009.0357
- Holzapfel, G.A., Ogden, R.W., 2006. *Mechanics of biological tissue*. Springer, Berlin. ISBN: 3642064353.

Literatura

- Hopkins, R.A., Hopkins, R.A., 2005. Cardiac reconstructions with allograft tissues. Springer-Verlag, New York.
- Horáková, J., 2015. Nanofibrous vascular grafts. Technická univerzita v Liberci, Liberec.
- Horká, J., Pohunková, H., 1990. Elastogenesis in the wall of the human thoracic aorta. *Folia Morphol (Praha)* 38, 38–43.
- Horny, L., Kronek, J., Chlup, H., Zitny, R., Vesely, J., Hulan, M., 2010. Orientations of collagen fibers in aortic histological section. *Bulletin of Applied Mechanics* 2010, 25–29.
- Horný, L., Netušil, M., Daniel, M., 2014a. Limiting extensibility constitutive model with distributed fibre orientations and ageing of abdominal aorta. *J Mech Behav Biomed Mater* 38, 39–51. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.05.021
- Horný, L., Netušil, M., Voňavková, T., 2014b. Axial prestretch and circumferential distensibility in biomechanics of abdominal aorta. *Biomech Model Mechanobiol* 13, 783–799. doi:10.1007/s10237-013-0534-8
- Houdek, K., Moláček, J., Třeška, V., Křížková, V., Eberlová, L., Boudová, L., Nedorost, L., Tolinger, P., Kočová, J., Kobr, J., Baxa, J., Liška, V., Witter, K., Tonar, Z., 2013. Focal histopathological progression of porcine experimental abdominal aortic aneurysm is mitigated by atorvastatin. *Int Angiol* 32, 291–306.
- Hu, J.-J., Ambrus, A., Fossum, T.W., Miller, M.W., Humphrey, J.D., Wilson, E., 2008. Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 359–370. doi:10.1369/jhc.7A7324.2007
- Hudák, R., Kachlík, D., Balko, J., Felšöová, S., Zavázalová, Š., 2015. *Memorix anatomie*. Triton.
- Humphrey, J.D., Holzapfel, G.A., 2012. Mechanics, mechanobiology, and modeling of human abdominal aorta and aneurysms. *J Biomech* 45, 805–814. doi:10.1016/j.jbiomech.2011.11.021
- Huygens, S.A., Mokhles, M.M., Hanif, M., Bekkers, J.A., Bogers, A.J.J.C., Rutten-van Mölken, M.P.M.H., Takkenberg, J.J.M., 2016. Contemporary outcomes after surgical aortic valve replacement with bioprostheses and allografts: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 50, 605–616. doi:10.1093/ejcts/ezw101
- Hwang, J.-Y., Johnson, P.Y., Braun, K.R., Hinek, A., Fischer, J.W., O'Brien, K.D., Starcher, B., Clowes, A.W., Merrilees, M.J., Wight, T.N., 2008. Retrovirally mediated overexpression of glycosaminoglycan-deficient biglycan in arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointimae after vascular injury. *Am. J. Pathol.* 173, 1919–1928. doi:10.2353/ajpath.2008.070875
- Ioannou, C.V., Stergiopoulos, N., Katsamouris, A.N., Startchik, I., Kalangos, A., Licker, M.J., Westerhof, N., Morel, D.R., 2003. Hemodynamics induced after acute

Literatura

- reduction of proximal thoracic aorta compliance. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 26, 195–204.
- Kapeller, K., Pospíšilová, V., 1991. *Embryológia človeka: Vysokošk. učeb. pre lek. fak.* Osveta, Martin.
- Karlson, P., Gerok, W., Gross, W., 1987. *Pathobiochemie*, 1. vydání. ed. Academia, Praha.
- Kim, J., Baek, S., 2011. Circumferential variations of mechanical behavior of the porcine thoracic aorta during the inflation test. *J Biomech* 44, 1941–1947.
doi:10.1016/j.jbiomech.2011.04.022
- Kim, J., Hong, J.-W., Baek, S., 2013. Longitudinal differences in the mechanical properties of the thoracic aorta depend on circumferential regions. *J Biomed Mater Res A* 101, 1525–1529. doi:10.1002/jbm.a.34445
- Ko, Y.S., Coppen, S.R., Dupont, E., Rothery, S., Severs, N.J., 2001. Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 355–364.
- Kochová, P., Kuncová, J., Švíglerová, J., Cimrman, R., Miklíková, M., Liška, V., Tonar, Z., 2012. The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries. *Physiological Measurement* 33, 1335–1351. doi:10.1088/0967-3334/33/8/1335
- Kochová, P., Witter, K., Tonar, Z., 2013. Distribution of orientation of smooth muscle bundles does not change along human great and small varicose veins. *Ann. Anat.* doi:10.1016/j.aanat.2013.10.005
- Kocová, J., 1970. Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels. *Folia Morphol (Praha)* 18, 293–295.
- Kocová, J., Tesar, Z., 1979. The development of the vascular system in man. *Cor Vasa* 21, 124–127.
- Kolpakov, V.A., Rekhter, M.D., Peretiak, L.P., Kulida, L.V., Mironov, A.A., 1993. [A comparative ultrastructural and morphometric analysis of the smooth myocytes in the tunicae intima and media of the human fetal aorta]. *Morfologija* 104, 80–87.
- Kříková, V., Korabecná, M., Kocová, J., Treska, V., Moláček, J., Tonar, Z., Tolinger, P., Nedorost, L., 2009. Quantification of plasminogen activator inhibitor type 1 in the aortic wall. *Int Angiol* 28, 44–49.
- Krška, Z., Hoskovec, D., Petruželka, L., 2014. *Chirurgická onkologie*. Grada, Praha.
- Krüger, T., Veseli, K., Lausberg, H., Vöhringer, L., Schneider, W., Schlensak, C., 2016. Regional and directional compliance of the healthy aorta: an ex vivo study in a porcine model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 23, 104–111.
doi:10.1093/icvts/ivw053
- Kubíková, T., Filová, E., Prosecká, E., Plencner, M., Králíčková, M., Tonar, Z., 2015. [Histological evaluation of biomaterials administration in vivo on the cartilage, bone and skin healing]. *Cas. Lek. Cesk.* 154, 110–114.

Literatura

- Kubikova, T., Kochova, P., Holecek, M., Plencner, M., Prosecka, E., Filova, E., Rampichova, M., Tonar, Z., 2016. In vivo microscopic and mechanical characteristics of bioengineered and biodegradable tissue scaffolds and nanomaterials., in: *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering Applications of Nanobiomaterials*, 1. Elsevier, Amsterdam, pp. 457–490.
- Kubíková, T., Kochová, P., Brázdil, J., Špatenka, J., Burkert, J., Králíčková, M., Tonar, Z., 2017a. The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 212, 17–26. doi:10.1016/j.aanat.2017.03.004
- Kubíková, T., Kochova, P., Fiala, R., Spatenka, J., Burkert, J., Kralickova, M., Tonar, Z., 2017b. Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. Presented at the Solid State Phenomena, Trans Tech Publications, pp. 341–344.
- Kucera, T., Strilić, B., Regener, K., Schubert, M., Laudet, V., Lammert, E., 2009. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS ONE* 4, e4132. doi:10.1371/journal.pone.0004132
- Kurobe, H., Maxfield, M.W., Tara, S., Rocco, K.A., Bagi, P.S., Yi, T., Udelsman, B., Zhuang, Z.W., Cleary, M., Iwakiri, Y., Breuer, C.K., Shinoka, T., 2015. Development of small diameter nanofiber tissue engineered arterial grafts. *PLoS ONE* 10, e0120328. doi:10.1371/journal.pone.0120328
- Lannoy, M., Slove, S., Jacob, M.-P., 2014. The function of elastic fibers in the arteries: beyond elasticity. *Pathol. Biol.* 62, 79–83. doi:10.1016/j.patbio.2014.02.011
- Laterreur, V., Ruel, J., Auger, F.A., Vallières, K., Tremblay, C., Lacroix, D., Tondreau, M., Bourget, J.-M., Germain, L., 2014. Comparison of the direct burst pressure and the ring tensile test methods for mechanical characterization of tissue-engineered vascular substitutes. *J Mech Behav Biomed Mater* 34, 253–263. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.02.017
- Lederman, A., Saliture Neto, F.T., Ferreira, R., de Figueiredo, L.F.P., Otoch, J.P., Aun, R., da Silva, E.S., 2014. Endovascular model of abdominal aortic aneurysm induction in swine. *Vasc Med* 19, 167–174. doi:10.1177/1358863X14534006
- Leeuwenburgh, B.P.J., Schoof, P.H., Steendijk, P., Baan, J., Mooi, W.J., Helbing, W.A., 2003. Chronic and adjustable pulmonary artery banding. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125, 231–237. doi:10.1067/mtc.2003.23
- Leitão, A.F., Faria, M.A., Faustino, A.M.R., Moreira, R., Mela, P., Loureiro, L., Silva, I., Gama, M., 2016. A Novel Small-Caliber Bacterial Cellulose Vascular Prosthesis: Production, Characterization, and Preliminary In Vivo Testing: A Novel Small-Caliber Bacterial Cellulose Vascular Prosthesis.... *Macromolecular Bioscience* 16, 139–150. doi:10.1002/mabi.201500251
- Lenting, P.J., Christophe, O.D., Denis, C.V., 2015. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 125, 2019–2028. doi:10.1182/blood-2014-06-528406

Literatura

- Li, Z.-Y., U-King-Im, J., Tang, T.Y., Soh, E., See, T.C., Gillard, J.H., 2008. Impact of calcification and intraluminal thrombus on the computed wall stresses of abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* 47, 928–935. doi:10.1016/j.jvs.2008.01.006
- Løkkegaard, A., Nyengaard, J.R., West, M.J., 2001. Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus* 11, 726–740. doi:10.1002/hipo.1088
- Lorentzen, K.A., Chai, S., Chen, H., Danielsen, C.C., Simonsen, U., Wogensen, L., 2016. Mechanisms involved in extracellular matrix remodeling and arterial stiffness induced by hyaluronan accumulation. *Atherosclerosis* 244, 195–203. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.016
- Lüllmann-Rauch, R., 2012. *Histologie*. Grada, Praha.
- Mahfoud, F., Lüscher, T.F., Andersson, B., Baumgartner, I., Cifkova, R., Dimario, C., Doevendans, P., Fagard, R., Fajadet, J., Komajda, M., Lefèvre, T., Lotan, C., Sievert, H., Volpe, M., Widimsky, P., Wijns, W., Williams, B., Windecker, S., Witkowski, A., Zeller, T., Böhm, M., European Society of Cardiology, 2013. Expert consensus document from the European Society of Cardiology on catheter-based renal denervation. *Eur. Heart J.* 34, 2149–2157. doi:10.1093/eurheartj/eh154
- Mahfoud, F., Moon, L.B., Pipenhagen, C.A., Jensen, J.A., Pathak, A., Papademetriou, V., Ewen, S., Linz, D., Böhm, M., 2016. Catheter-based radio-frequency renal nerve denervation lowers blood pressure in obese hypertensive swine model. *J. Hypertens.* 34, 1854–1862. doi:10.1097/HJH.0000000000001021
- Marra, S.P., Daghljan, C.P., Fillinger, M.F., Kennedy, F.E., 2006. Elemental composition, morphology and mechanical properties of calcified deposits obtained from abdominal aortic aneurysms. *Acta Biomater* 2, 515–520. doi:10.1016/j.actbio.2006.05.003
- Martin, C., Sun, W., 2012. Biomechanical characterization of aortic valve tissue in humans and common animal models. *J Biomed Mater Res A* 100, 1591–1599. doi:10.1002/jbm.a.34099
- Martinez-Lemus, L.A., Hill, M.A., Meininger, G.A., 2009. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda)* 24, 45–57. doi:10.1152/physiol.00029.2008
- Mattson, J.M., Turcotte, R., Zhang, Y., 2017. Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 16, 213–225. doi:10.1007/s10237-016-0811-4
- McEver, R.P., 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* 107, 331–339. doi:10.1093/cvr/cvv154
- Metzler, S.A., Digesu, C.S., Howard, J.I., Filip To, S.D., Warnock, J.N., 2012. Live en face imaging of aortic valve leaflets under mechanical stress. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 355–361. doi:10.1007/s10237-011-0315-1

Literatura

- Meyers, M.A., Chen, P.-Y., Lin, A.Y.-M., Seki, Y., 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science* 53, 1–206. doi:10.1016/j.pmatsci.2007.05.002
- Mills, S.E. (Ed.), 2012. *Histology for pathologists: [includes online access for fully searchable text and image bank]*, 4. ed. ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia.
- Monhart, V., 2013. Renální denervace. *Interní Med.* 2013, 349–351.
- Mouton, P.R., 2002. *Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists.* Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Mrówczyński, W., Mugnai, D., de Valence, S., Tille, J.-C., Khabiri, E., Cikirikcioglu, M., Möller, M., Walpoth, B.H., 2014. Porcine carotid artery replacement with biodegradable electrospun poly-ε-caprolactone vascular prosthesis. *J. Vasc. Surg.* 59, 210–219. doi:10.1016/j.jvs.2013.03.004
- Nedorost, L., Uemura, H., Furck, A., Saeed, I., Slavik, Z., Kobr, J., Tonar, Z., 2013. Vascular histopathologic reaction to pulmonary artery banding in an in vivo growing porcine model. *Pediatr Cardiol* 34, 1652–1660. doi:10.1007/s00246-013-0699-z
- Newby, A., 2006. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular Research* 69, 614–624. doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.002
- Niederhoffer, N., Lartaud-Idjouadiene, I., Giummelly, P., Duvivier, C., Peslin, R., Atkinson, J., 1997. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension* 29, 999–1006.
- Novotny, R., Slizova, D., Hlubocky, J., Krs, O., Spatenka, J., Burkert, J., Fiala, R., Mitas, P., Mericka, P., Spacek, M., Hlubocka, Z., Lindner, J., 2017. Cryopreserved human aortic root allografts arterial wall: Structural changes occurring during thawing. *PLoS ONE* 12, e0175007. doi:10.1371/journal.pone.0175007
- Otto, S., Baum, T., Keller, F., 2006. Sex-dependence of the relative number of elastic fibres in human heart valves. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 188, 153–158. doi:10.1016/j.aanat.2005.08.017
- Pařízek, M., 2012. *Interakce cévních a kostních buněk s bioaktivními polymery pro konstrukci tkáňových náhrad.* Praha.
- Piler, P., Fila, P., 2008. Aneurizma hrudní aorty. *Kardiolog Rev Int Med* 2008, 18–25.
- Polzer, S., Gasser, T.C., Novak, K., Man, V., Tichy, M., Skacel, P., Bursa, J., 2015. Structure-based constitutive model can accurately predict planar biaxial properties of aortic wall tissue. *Acta Biomater* 14, 133–145. doi:10.1016/j.actbio.2014.11.043
- Prot, V., Skallerud, B., Sommer, G., Holzapfel, G.A., 2010. On modelling and analysis of healthy and pathological human mitral valves: two case studies. *J Mech Behav Biomed Mater* 3, 167–177. doi:10.1016/j.jmbbm.2009.05.004

Literatura

- Qiao, J.H., Fishbein, M.C., Demer, L.L., Lusis, A.J., 1995. Genetic determination of cartilaginous metaplasia in mouse aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2265–2272.
- Rader, F., Sachdev, E., Arsanjani, R., Siegel, R.J., 2015. Left Ventricular Hypertrophy in Valvular Aortic Stenosis: Mechanisms and Clinical Implications. *The American Journal of Medicine* 128, 344–352. doi:10.1016/j.amjmed.2014.10.054
- Rao, R.N., Falls, D.G., Gerrity, R.G., Sethuraman, S.N., Thiruvaiyaru, D.S., 2000. Intimal thickness and layering, and smooth muscle cell phenotypes in aorta of youth. *Pathobiology* 68, 18–28. doi:28111
- Reddy, S., Kumar, P., Prasad, K., 2011. Histomorphometric and sympathetic innervation of the human renal artery: A cadaveric study. *Urol Ann* 3, 141–146. doi:10.4103/0974-7796.84968
- Rezakhaniha, R., Aghianniotis, A., Schrauwen, J.T.C., Griffa, A., Sage, D., Bouten, C.V.C., van de Vosse, F.N., Unser, M., Stergiopoulos, N., 2012. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 461–473. doi:10.1007/s10237-011-0325-z
- Rippy, M.K., Zarins, D., Barman, N.C., Wu, A., Duncan, K.L., Zarins, C.K., 2011. Catheter-based renal sympathetic denervation: chronic preclinical evidence for renal artery safety. *Clin Res Cardiol* 100, 1095–1101. doi:10.1007/s00392-011-0346-8
- Roach, M.R., Song, S.H., 1994. Variations in strength of the porcine aorta as a function of location. *Clin Invest Med* 17, 308–318.
- Rosa, J., 2017. Renální denervace ve srovnání k intenzifikované farmakoterapii u skutečně rezistentní hypertenze. 2leté výsledky randomizované studie PRAGUE-15 6., 19–21.
- Rosa, J., Widimský, P., Waldauf, P., Lambert, L., Zelinka, T., Táborský, M., Branny, M., Toušek, P., Petrák, O., Čurila, K., Bednář, F., Holaj, R., Štrauch, B., Václavík, J., Nykl, I., Krátká, Z., Kociánová, E., Jiravský, O., Rappová, G., Indra, T., Widimský, J., 2016. Role of Adding Spironolactone and Renal Denervation in True Resistant Hypertension: One-Year Outcomes of Randomized PRAGUE-15 Study. *Hypertension* 67, 397–403. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06526
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2016. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, Seventh edition. ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.
- Saari, P., Lähtenvuo, M., Honkonen, K., Manninen, H., 2012. Antegrade in situ fenestration of aortic stent graft: in-vivo experiments using a pig model. *Acta Radiol* 53, 754–758. doi:10.1258/ar.2012.120263
- Saddoughi, S.A., Abel, M.D., Maleszewski, J.J., Schaff, H.V., 2017. Acute aortitis of the ascending aorta. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. doi:10.1093/icvts/ivx059
- Sadler, T.W., 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada, Praha.
- Sakakura, K., Ladich, E., Cheng, Q., Otsuka, F., Yahagi, K., Fowler, D.R., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Joner, M., 2014. Anatomic assessment of sympathetic peri-arterial

Literatura

- renal nerves in man. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 635–643.
doi:10.1016/j.jacc.2014.03.059
- Sakakura, K., Tunev, S., Yahagi, K., O'Brien, A.J., Ladich, E., Kolodgie, F.D., Melder, R.J., Joner, M., Virmani, R., 2015. Comparison of histopathologic analysis following renal sympathetic denervation over multiple time points. *Circ Cardiovasc Interv* 8, e001813. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001813
- Saleh Al-Shehabi, T., Iratni, R., Eid, A.H., 2016. Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Phytomedicine* 23, 1068–1081. doi:10.1016/j.phymed.2015.10.016
- Schriebl, A.J., Zeindlinger, G., Pierce, D.M., Regitnig, P., Holzapfel, G.A., 2012. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries. *J R Soc Interface* 9, 1275–1286. doi:10.1098/rsif.2011.0727
- Scott, J.E., 1988. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.* 252, 313–323.
- Scott, J.E., Orford, C.R., 1981. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.* 197, 213–216.
- Sehgel, N.L., Zhu, Y., Sun, Z., Trzeciakowski, J.P., Hong, Z., Hunter, W.C., Vatner, D.E., Meininger, G.A., Vatner, S.F., 2013. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, H1281–1287. doi:10.1152/ajpheart.00232.2013
- Shadwick, R.E., 1999. Mechanical design in arteries. *J. Exp. Biol.* 202, 3305–3313.
- Silver, F.H., Horvath, I., Foran, D.J., 2001. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers. *Crit Rev Biomed Eng* 29, 279–301.
- Silver, M.D., Gotlieb, A.I., Schoen, F.J. (Eds.), 2001. *Cardiovascular pathology*, 3rd ed. ed. Churchill Livingstone, New York.
- Slažanský, M., 2014. Počítačová simulace dvouosých tahových zkoušek měkkých tkání. Vysoké učení technické v Brně, Brno.
- Sokolis, D.P., 2007. Passive mechanical properties and structure of the aorta: segmental analysis. *Acta Physiol (Oxf)* 190, 277–289. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01661.x
- Sokolis, D.P., Boudoulas, H., Karayannacos, P.E., 2008. Segmental differences of aortic function and composition: clinical implications. *Hellenic J Cardiol* 49, 145–154.
- Sokolis, D.P., 2010. A passive strain-energy function for elastic and muscular arteries: correlation of material parameters with histological data. *Med Biol Eng Comput* 48, 507–518. doi:10.1007/s11517-010-0598-x
- Sokolis, D.P., Savva, G.D., Papadodima, S.A., Kourkoulis, S.K., 2017. Regional distribution of circumferential residual strains in the human aorta according to age and gender. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 67, 87–100. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.12.003
- Sokolis, D.P., Zarbis, N., Dosios, T., Papalouka, V., Papadimitriou, L., Boudoulas, H., Karayannacos, P.E., 2005. Post-vagotomy mechanical characteristics and structure

Literatura

- of the thoracic aortic wall. *Ann Biomed Eng* 33, 1504–1516. doi:10.1007/s10439-005-7118-4
- Sosa-Melgarejo, J.A., Berry, C.L., 1995. Myoendothelial contacts in the human fetal aorta. *Arch. Med. Res.* 26, 431–435.
- Spatenka, J., Kostelka, M., Kobylka, P., Hucín, B., Honěk, T., Lochmann, O., Hájek, T., Tláškal, T., Povýsilová, V., Fiser, B., 1997. [Preparation, storage, transportation and use of heart valves for allotransplantation]. *Rozhl Chir* 76, 118–125.
- Stoyan, D., Kendall, W.S., Mecke, J., 1995. *Stochastic geometry and its applications*, 2nd ed. ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley, Chichester ; New York.
- Stradins, P., 2004. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve*1. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 26, 634–639. doi:10.1016/j.ejcts.2004.05.043
- Strilić, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M.R., McNagny, K.M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., Lammert, E., 2009. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev. Cell* 17, 505–515. doi:10.1016/j.devcel.2009.08.011
- Suk, P., Cundrle, I., Hrudá, J., Vocilková, L., Konecny, Z., Vlasin, M., Matejovic, M., Pavlik, M., Zvoníček, V., Sramek, V., 2012. Porcine model of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 43, 698–704. doi:10.1016/j.ejvs.2012.02.020
- Szpak, P., 2011. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science* 38, 3358–3372. doi:10.1016/j.jas.2011.07.022
- Szpinda, M., 2007. Morphometric study of the ascending aorta in human fetuses. *Ann. Anat.* 189, 465–472. doi:10.1016/j.aanat.2007.01.007
- Táborský, M., Richter, D., Tonar, Z., Kubíková, T., Herman, A., Peregrin, J., Červenková, L., Husková, Z., Kopkan, L., 2017. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. *Physiol Res*.
- Tanios, F., Gee, M.W., Pelisek, J., Kehl, S., Biehler, J., Grabher-Meier, V., Wall, W.A., Eckstein, H.-H., Reeps, C., 2015. Interaction of biomechanics with extracellular matrix components in abdominal aortic aneurysm wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 50, 167–174. doi:10.1016/j.ejvs.2015.03.021
- Tara, S., Kurobe, H., Maxfield, M.W., Rocco, K.A., Yi, T., Naito, Y., Breuer, C.K., Shinoka, T., 2015. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J. Vasc. Surg.* 62, 734–743. doi:10.1016/j.jvs.2014.03.011
- Thiesen, S.L., Rosenquist, T.H., 1995. Expression of collagens and decorin during aortic arch artery development: implications for matrix pattern formation. *Matrix Biol.* 14, 573–582.

Literatura

- Thyberg, J., Hedin, U., Sjölund, M., Palmberg, L., Bottger, B.A., 1990. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 10, 966–990.
- Tillman, B.W., Yazdani, S.K., Lee, S.J., Geary, R.L., Atala, A., Yoo, J.J., 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials* 30, 583–588. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.006
- Tonar, Z., Janáček, J., Nedorost, L., Grill, R., Báca, V., Zátura, F., 2009. Analysis of microcracks caused by drop shatter testing of porcine kidneys. *Ann. Anat.* 191, 294–308. doi:10.1016/j.aanat.2009.02.005
- Tonar, Z., Kural, T., Kochová, P., Nedorost, L., Witter, K., 2012. Vasa vasorum quantification in human varicose great and small saphenous veins. *Ann. Anat.* 194, 473–481. doi:10.1016/j.aanat.2012.02.019
- Tonar, Z., Kubíková, T., Prior, C., Demjén, E., Liška, V., Králíčková, M., Witter, K., 2015a. Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta. *Ann. Anat.* 201, 79–90. doi:10.1016/j.aanat.2015.05.005
- Tonar, Z., Kochova, P., Cimrman, R., Perktold, J., Witter, K., 2015b. Segmental differences in the orientation of smooth muscle cells in the tunica media of porcine aortae. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 14, 315–332. doi:10.1007/s10237-014-0605-5
- Tonar, Z., Tomášek, P., Loskot, P., Janáček, J., Králíčková, M., Witter, K., 2016. Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 205, 22–36. doi:10.1016/j.aanat.2016.01.008
- Tonar, Z., Kochová, P., Cimrman, R., Perktold, J., Kubíková, T., Demjen, E., Liška, V., Králíčková, M., Witter, K., 2017. Links between the Orientation of Vascular Smooth Muscle and Microscopical Composition of Aortic Segments. *Solid State Phenomena* 258, 329–332. doi:10.4028/www.scientific.net/SSP.258.329
- Tsamis, A., Krawiec, J.T., Vorp, D.A., 2013. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *Journal of The Royal Society Interface* 10, 20121004–20121004. doi:10.1098/rsif.2012.1004
- Tsioufis, C.P., Papademetriou, V., Dimitriadis, K.S., Kasiakogias, A., Tsiachris, D., Worthley, M.I., Sinhal, A.R., Chew, D.P., Meredith, I.T., Malaiapan, Y., Thomopoulos, C., Kallikazaros, I., Tousoulis, D., Worthley, S.G., 2015. Catheter-based renal denervation for resistant hypertension: Twenty-four month results of the EnligHTN I first-in-human study using a multi-electrode ablation system. *Int. J. Cardiol.* 201, 345–350. doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.069
- Turnbull, I.C., Hadri, L., Rapti, K., Sadek, M., Liang, L., Shin, H.J., Costa, K.D., Marin, M.L., Hajjar, R.J., Faries, P.L., 2011. Aortic implantation of mesenchymal stem cells after aneurysm injury in a porcine model. *J. Surg. Res.* 170, e179-188. doi:10.1016/j.jss.2011.05.042
- Tzafiriri, A.R., Mahfoud, F., Keating, J.H., Markham, P.M., Spognardi, A., Wong, G., Fuimaono, K., Böhm, M., Edelman, E.R., 2014. Innervation patterns may limit

Literatura

- response to endovascular renal denervation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 1079–1087. doi:10.1016/j.jacc.2014.07.937
- Vacek, Z., 2006. Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada, Praha.
- Valencia Rivero, K.T., Jaramillo Escobar, J., Galvis Forero, S.D., Miranda Saldaña, M.C., López Panqueva, R.D.P., Sandoval Reyes, N.F., Briceño Triana, J.C., 2017. New Regenerative Vascular Grafts for Hemodialysis Access: Evaluation of a Preclinical Animal Model. *J Invest Surg* 1–9. doi:10.1080/08941939.2017.1303100
- Vejvoda, J., Alan, D., Ošťádal, P., 2005. Disekce aorty. *Interv Akut Kardiol* 2005, 159–165.
- Venkatasubramanian, R.T., Grassl, E.D., Barocas, V.H., Lafontaine, D., Bischof, J.C., 2006. Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries. *Ann Biomed Eng* 34, 823–832. doi:10.1007/s10439-005-9044-x
- Venkatasubramanian, R.T., Wolkers, W.F., Sheno, M.M., Barocas, V.H., Lafontaine, D., Soule, C.L., Iaizzo, P.A., Bischof, J.C., 2010. Freeze-thaw induced biomechanical changes in arteries: role of collagen matrix and smooth muscle cells. *Ann Biomed Eng* 38, 694–706. doi:10.1007/s10439-010-9921-9
- Vesely, I., 1998. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech* 31, 115–123.
- Vincent, J.F.V., 1990. Structural biomaterials, Rev. ed. ed. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Vogel, K.G., Trotter, J.A., 1987. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Coll. Relat. Res.* 7, 105–114.
- Vojáček, J., Mokráček, A., Spatenka, J., Vambera, M., Sulda, M., Setina, M., Burkert, J., Pavel, P., Pepper, J., 2006. Implantation of cryopreserved mitral allograft into the tricuspid position in an experimental study in sheep: technical aspects of implantation and immediate results evaluated by epicardial echocardiography. *Zentralbl Chir* 131, 511–516. doi:10.1055/s-2006-955455
- Wagenseil, J.E., Mecham, R.P., 2009. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews* 89, 957–989. doi:10.1152/physrev.00041.2008
- Wang, Z., Chesler, N.C., 2012. Role of collagen content and cross-linking in large pulmonary arterial stiffening after chronic hypoxia. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 11, 279–289. doi:10.1007/s10237-011-0309-z
- Weinberg, E.J., Shahmirzadi, D., Mofrad, M.R.K., 2010. On the multiscale modeling of heart valve biomechanics in health and disease. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 9, 373–387. doi:10.1007/s10237-009-0181-2
- Williams, B., 1998. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J. Hypertens.* 16, 1921–1929.
- Wilson, J.S., Baek, S., Humphrey, J.D., 2012. Importance of initial aortic properties on the evolving regional anisotropy, stiffness and wall thickness of human abdominal aortic aneurysms. *J R Soc Interface* 9, 2047–2058. doi:10.1098/rsif.2012.0097

- Witter, K., Tonar, Z., Matejka, V.M., Martinca, T., Jonák, M., Rokosný, S., Pirk, J., 2010. Tissue reaction to three different types of tissue glues in an experimental aorta dissection model: a quantitative approach. *Histochem. Cell Biol.* 133, 241–259. doi:10.1007/s00418-009-0656-3
- Witter, K., Tonar, Z., Schöpfer, H., 2017. How many Layers has the Adventitia? - Structure of the Arterial Tunica Externa Revisited. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 46, 110–120. doi:10.1111/ah.12239
- Witzenburg, C.M., Dhume, R.Y., Shah, S.B., Korenczuk, C.E., Wagner, H.P., Alford, P.W., Barocas, V.H., 2017. Failure of the Porcine Ascending Aorta: Multidirectional Experiments and a Unifying Microstructural Model. *J Biomech Eng* 139. doi:10.1115/1.4035264
- Worthley, S.G., Tsioufis, C.P., Worthley, M.I., Sinhal, A., Chew, D.P., Meredith, I.T., Malaiapan, Y., Papademetriou, V., 2013. Safety and efficacy of a multi-electrode renal sympathetic denervation system in resistant hypertension: the EnligHTN I trial. *Eur. Heart J.* 34, 2132–2140. doi:10.1093/eurheartj/eh197
- Xu, J., Shi, G.-P., 2014. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842, 2106–2119. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.008
- Yamamoto, M., Yamamoto, K., Noumura, T., 1993. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp. Cell Res.* 204, 121–129. doi:10.1006/excr.1993.1016
- Yuan, S.-M., Jing, H., 2011. Cystic medial necrosis: pathological findings and clinical implications. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 26, 107–115.
- Zheng, W., Wang, Z., Song, L., Zhao, Q., Zhang, J., Li, D., Wang, S., Han, J., Zheng, X.-L., Yang, Z., Kong, D., 2012. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials* 33, 2880–2891. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.047
- Zilla, P., von Oppell, U., Deutsch, M., 1993. The endothelium: a key to the future. *J Card Surg* 8, 32–60.
- Žižka, J., 1994. Diagnostika syndromů a malformací. Galén, Praha.

9 Seznam obrázků

Obr 1. Schematický přehled základních rozdílů mezi fenotypy hladkých svalových buněk (upraveno podle Thyber et al., 1990).	16
Obr 2. Bodová testovací mřížka pro odhad plošného podílu elastických vláken ve stěně aorty.	32
Obr 3. Schéma zatěžování materiálu při jednoosé zkoušce tahem (Kubikova et al., 2016).	34
Obr 4. Příklad obecné křivky napětí-deformace s kritickými body (Kubikova et al., 2016).	35
Obr 5. Vzorkování prasečí aorty (Tonar et al., 2015a).	43
Obr 6. Výběr zorných polí pro odhad plošných podílů jednotlivých složek stěny aorty (Tonar et al., 2015a).	44
Obr 7. Směr hladkých svalových buněk (Tonar et al., 2017).	45
Obr 8. Histologické barvicí metody použité při analýze složení kořene aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a, 2017b).	48
Obr 9. Schéma odběru vzorků z cípů aortální/pulmonální chlopně a směr jejich zatěžování při mechanické analýze (Kubíková et al., 2017).	49
Obr 10. Studium vztahu mezi mikrotrhlinami a elastickými vlákny (Kubíková et al., 2017a).	51
Obr 11. Histologické posouzení poškození renální tepny po indukované denervaci renální tepny v příčných histologických řezech, uspořádané podle semikvantitativní stupnice (Táborský et al., 2017).	55
Obr 12. Histologické hodnocení poškození nervů doprovázejících renální tepnu v příčných histologických řezech, uspořádané podle semikvantitativní stupnice (Táborský et al., 2017).	56
Obr 13. Plošný podíl (A_A) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tloušťka stěny v pěti aortálních proximodistálních segmentech (Tonar et al., 2015a).	61
Obr 14. Plošný podíl (A_A) elastinu (A), kolagenu (B), hladkosvalového aktinu (C), desminu (D) a vimentinu (E) v tunica media aorty a tloušťka stěny aorty ve třech věkových skupinách prasat (Tonar et al., 2015a).	62
Obr 15. Obsah elastinu a kolagenu v tunica media aorty u selat (vlevo) a výkrmových prasat (vpravo) (Tonar et al., 2015a).	65
Obr 16. Podíl aktinu, desminu a vimentinu v tunica media aorty selat (vlevo) a odstavených selat (vpravo) (Tonar et al., 2015a).	66
Obr 17. Křivky z mechanického zatěžování aorty (Kubíková et al., 2017a).	68
Obr 18. Porovnání aorty a plicnice (Kubíková et al., 2017a).	69
Obr 19. Kalcifikace ve stěně plicnice (Kubíková et al., 2017a).	70
Obr 20. Křivky z mechanického zatěžování cípu chlopně (Kubíková et al., 2017a).	72
Obr 21. Porovnání cípů aortální (vlevo) a pulmonální chlopně (vpravo) (Kubíková et al., 2017a).	73
Obr 22. Porovnání teoretické (P_L) a reálné (P_L') hustoty průsečíků mezi trhlinou a elastickými vlákny (Kubíková et al., 2017a).	74
Obr 23. Porovnání poškození cév a nervů u obou katetrů v renálních tepnách po ablaci a bez ablaci.	75

Obr. 24. Porovnání účinků dvou typů katetrů na renální tepnu a nervová vlákna probíhající kolem ní po ablaci (Táborský et al., 2017).....	76
Obr. 25. Příklady histologických nálezů cévního poškození u obou skupin zvířat po ablaci s použitím katetru Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN katetru (vpravo) (Táborský et al., 2017).	78
Obr. 26. Příklady histologických nálezů poškozených nervů u obou skupin zvířat po ablaci katetrem Symplicity Flex (vlevo) a EnligHTN (vpravo) (Táborský et al., 2017).....	79
Obr. 27. Vzorky barvené hematoxylinem-eosinem použité pro hodnocení tloušťky štěpu a relativní distribuce a hustoty profilů jader buněk prostupujících štěpem.	80
Obr. 28. Vzorky barvené orceinem, použité pro hodnocení plošného podílu elastinu (tmavě hnědý) v cévní náhradě.	81
Obr. 29. Vzorky barvené pikrosiriovou červení a pozorované v polarizačním světle pro hodnocení plošného podílu kolagenu (červený) v cévní náhradě.	82
Obr. 30. Imunohistochemická detekce α -hladkosvalového aktinu (hnědá) použitá pro hodnocení jeho plošného podílu v cévní náhradě.	83
Obr. 31. Metaplazie v chrupavku v cévních náhradách po 6 měsících.	85
Obr. 32. Endotelová výstelka u obou typů náhrad.	86

10 Seznam tabulek

Tabulka 1. Přehledné barvení s příklady použití.	29
Tabulka 2. Imunohistochemické metody s příklady použití.	30
Tabulka 3. Parametry kvantitativní analýzy vzorků a interpretace jejich biologického významu.	33
Tabulka 4. Vzorkování mikrofotografií pro měření histologických parametrů (Kubíková et al., 2017a, 2017b).	47
Tabulka 5. Vzorkování mikrofotografií pro měření histologických parametrů cípů aortální a pulmonální chlopně (Kubíková et al., 2017a, 2017b).	50
Tabulka 6. Semikvantitativní stupnice pro hodnocení poškození renální tepny a přilehlých nervových pletení v příčně orientovaných řezech segmentů tepny (Táborský et al., 2017).	53
Tabulka 7. Způsob vyhodnocení získaných hodnot ze skórovacího systému (Táborský et al., 2017).	54
Tabulka 8. Kvantitativní parametry použité pro studii morfologie stěny vaskulárních štěpů.	58
Tabulka 9. Korelace kvantitativních parametrů.	63
Tabulka 10. Výsledky Pearsonova korelačního testu mezi orientací hladkých svalových buněk, plošnými podíly složek v tunica media aorty a tloušťkou intima-media (IMT) (Tonar et al., 2017).	67
Tabulka 11. Korelace mezi parametry z mechanické a histologické analýzy.	71

11 Publikace autorky

11.1 Publikace autorky vztahující se k tématu dizertační práce

11.1.1 Časopisy s impakt faktorem

KUBÍKOVÁ, T., KOCHOVÁ, P., BRÁZDIL, J., ŠPATENKA, J., BURKERT, J., KRÁLÍČKOVÁ, M., TONAR, Z. The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Ann Anat.* 2017; 212:(17-26). DOI: 10.1016/j.aanat.2017.03.004. IF=1.308.

TONAR, Z., **KUBIKOVA, T.**, PRIOR, C., DEMJEN, E., LISKA, V., KRALICKOVA, M., WITTER, K. Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2015; 201:79-90. DOI: 10.1016/j.aanat.2015.05.005. ISSN 0940-9602. IF=1.483.

TÁBORSKÝ, M., RICHTER, D., TONAR, Z., **KUBÍKOVÁ, T.**, HERMAN, A., PEREGRIN, J., ČERVENKOVÁ, L., HUSKOVÁ, Z., KOPKAN, L. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. *Physiol Res* 2017. IF=1.643.

11.1.2 Recenzované časopisy

KUBIKOVA, T., KOCHOVA, P., FIALA, R., SPATENKA, J., BURKERT, J., KRALICKOVA, M., TONAR, Z. Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. *Solid State Phenomena* 2017; 341-344.

TONAR, Z., KOCHOVA, P., CIMRMAN, R., PERKTOLD, J., **KUBIKOVA, T.**, DEMJEN, E., LISKA, V., KRALICKOVA, M., WITTER, K. Links between the orientation of vascular smooth muscle and microscopical composition of aortic segments. *Solid State Phenomena*; 2017; 329-332.

11.1.3 Kapitola v knize

KUBIKOVA, T., KOCHOVA, P., HOLECEK, M., PLENCNER, M., PROSECKA, E., FILOVA, E., RAMPICHOVA, M., TONAR, Z. In vivo microscopic and mechanical characteristics of bioengineered and biodegradable tissue scaffolds and nanomaterials. In: Grumezescu A. M. (Ed): Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering Applications of Nanobiomaterials, Volume 5. Elsevier, Amsterdam, 2016; 457-490.

11.2 Publikace autorky nevztahující se k tématu dizertační práce

11.2.1 Časopisy s impakt faktorem

BABUSKA, V., MOZTARZADEH, O., **KUBIKOVA, T.**, MOZTARZADEH, A., HRUSAK, D., TONAR, Z. Evaluating the osseointegration of nanostructured titanium implants in animal models: Current experimental methods and perspectives. *Biointerphases* 2016. IF=2.677.

JUNATAS, K. L., TONAR, Z., **KUBIKOVA, T.**, LISKA, V., PALEK, R., MIK, P., KRALICKOVA, M, WITTER, K. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. *Journal of Anatomy* 2016. IF= 2.154.

JARKOVSKA, D., BLUDOVSKA, M., MISTROVA, E., KRIZKOVA, V., KOTYZOVA, D., **KUBIKOVA, T.**, SLAVIKOVA, J., CHOTTOVA DVORAKOVA, M. Expression of classical mediators in the hearts of rats with hepatic dysfunction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. IF=1.91. Accepted for publication.

POLIVKA, J., HOLUBEC, L., **KUBIKOVA, T.**, PRIBAN, V., HES, O., PIVOVARCIKOVA, K., TRESKOVA, I. Advances in experimental targeted therapy and immunotherapy for patients with glioblastoma multiforme. *Anticancer Research* 2017; 21-33. IF=1.895.

Publikace autorky

HOLUBEC, L., POLIVKA, J., LISNEROVA, L., **KUBIKOVA, T.**, SAFANDA, M. The Effectiveness of Fibrile Neutropenia Prophylaxis with Lipegfilgrastim in Routine Clinical Practice. *In Vivo* 2017; 31(3):303-306. IF=0.832.

11.2.2 Recenzované časopisy

KUBIKOVA, T., FILOVA, E., PROSECKA, E., PLENCNER, M., KRALICKOVA, M., TONAR, Z. Histological evaluation of the impact of in vivo application of biomaterials on the healing of cartilage, bone and skin. *Journal of Czech Physicians* 2015; 154(3):110-4. Review. Czech.

TOMASEK, P., DOHNALOVA, P., **KUBIKOVA, T.**, KRALICKOVA, M., BERAN, M., TONAR, Z. Arytmogenic ventricular cardiomyopathy. *Forensic Medicine* 2015; 60(4):51-6. Czech.

12 Seznam příloh

Příloha I:

KUBÍKOVÁ, T., KOCHOVÁ, P., BRÁZDIL, J., ŠPATENKA, J., BURKERT, J., KRÁLÍČKOVÁ, M., TONAR, Z. The composition and biomechanical properties of human cryopreserved aortas, pulmonary trunks, and aortic and pulmonary cusps. *Ann Anat.* 2017; 212:(17-26). DOI: 10.1016/j.aanat.2017.03.004. IF=1.308.

Příloha II:

TONAR, Z., **KUBIKOVA, T.**, PRIOR, C., DEMJEN, E., LISKA, V., KRALICKOVA, M., WITTER, K. Segmental and age differences in the elastin network, collagen, and smooth muscle phenotype in the tunica media of the porcine aorta. *Ann Anat.* 2015; 201:79-90. DOI: 10.1016/j.aanat.2015.05.005. ISSN 0940-9602. IF=1.483.

Příloha III:

TÁBORSKÝ, M., RICHTER, D., TONAR, Z., **KUBÍKOVÁ, T.**, HERMAN, A., PEREGRIN, J., ČERVENKOVÁ, L., HUSKOVÁ, Z., KOPKAN, L. Early morphologic alterations in renal artery wall and renal nerves in response to catheter-based renal denervation procedure in sheep: difference between single-point and multiple-point ablation catheters. *Physiol Res* 2017. IF=1.643.

Příloha IV:

KUBIKOVA, T., KOCHOVA, P., FIALA, R., SPATENKA, J., BURKERT, J., KRALICKOVA, M., TONAR, Z. Histological Composition and Mechanical Properties of Cryopreserved Samples of Aortic and Pulmonary Valves. *Solid State Phenomena* 2017; 341-344.

Příloha V:

TONAR, Z., KOCHOVA, P., CIMRMAN, R., PERKTOLD, J., **KUBIKOVA, T.**, DEMJEN, E., LISKA, V., KRALICKOVA, M., WITTER, K. Links between the orientation of vascular smooth muscle and microscopical composition of aortic segments. *Solid State Phenomena*; 2017; 329-332.

Příloha VI:

KUBIKOVA, T., KOCHOVA, P., HOLECEK, M., PLENCNER, M., PROSECKA, E., FILOVA, E., RAMPICHOVA, M., TONAR, Z. In vivo microscopic and mechanical characteristics of bioengineered and biodegradable tissue scaffolds and nanomaterials. In: Grumezescu A. M. (Ed): *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering Applications of Nanobiomaterials*, Volume 5. Elsevier, Amsterdam, 2016; 457-490.