

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:
Biologie a patologie buňky



MUDr. Tomáš Novotný

Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště
za experimentálních podmínek

Morphological changes of cardiopulmonary vascular system
under experimental conditions

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Luděk Vajner, CSc.

Praha, 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 01.12. 2017

Tomáš Novotný

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

NOVOTNÝ, Tomáš. *Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště za experimentálních podmínek. [Morphological changes of cardiopulmonary vascular system under experimental conditions.]*. Praha, 2017. Počet stran 97. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie 2. LF UK. Vedoucí závěrečné práce Vajner, Luděk.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli doc. MVDr. Ludkovi Vajnerovi, CSc. za jeho odborné vedení při postgraduálním studiu a při sestavování dizertační práce.

Děkuji také pracovníkům Ústavu histologie a embryologie 2.LF UK, zejména pak MUDr. Jiřímu Uhlíkovi Ph.D. a laborantce Karolíně Vráblové za jejich pomoc a cenné rady.

Závěrem děkuji své rodině za trpělivost a podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÉ POZADÍ	10
3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	13
3.1. Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4denní hypoxie	13
3.2. Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie	15
4. METODIKA	17
4.1. Rozdělení experimentálních zvířat do pokusných skupin	17
4.2. Histologické techniky nekroptických vzorků	19
4.2.1. Odběr, základní histologické zpracování vzorků	19
4.2.2. Základní barvení.....	19
4.2.3. Imunohistochemický průkaz matrix metaloproteinázy 13.....	20
4.2.4. Imunohistochemický průkaz kolagenu typu VI	20
4.3. Metodika kvalitativního a kvantitativního posouzení preparátů.....	21
4.3.1. Kategorizace plicních artérií.....	21
4.3.2. Kvantifikace změn v distribuci periarteriálních žírných buněk.....	22
4.3.3. Kvantifikace “Double laminated vessels“	23
4.3.4. Metodika plošných měření tloušťky vrstev stěny velkých vodivých artérií a myokardu pravé komory srdce pomocí analyzátoru obrazu.....	24
4.3.5. Metodika měření průměrné tloušťky kardiomyocytů jednotlivých podvrstev myokardu pomocí analyzátoru obrazu.....	25
4.3.6. Statistické zpracování výsledků	26

5. VÝSLEDKY	27
5.1. Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4denní hypoxie.....	27
5.1.1. Morfologie prealveolárních artérií.....	27
5.1.2. Morfologie osvalených periferních artérií.....	32
5.1.3. Morfologie velkých vodivých artérií.....	37
5.1.4. Změny v procentuálním zastoupení “Double laminated vessels“.....	44
5.1.5. Změny v distribuci toluidinovou modří detekovatelných žírných Buněk.....	45
5.1.6. Změny v distribuci matrix metaloproteináza 13 pozitivních žírných buněk.....	46
5.1.7. Morfometrické změny pravé komory srdeční.....	47
5.1.8. Změny ve výsledné váze potkanů.....	48
5.2. Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie.....	49
5.2.1. Morfologie prealveolárních artérií.....	49
5.2.2. Morfologie osvalených periferních artérií.....	55
5.2.3. Morfologie velkých vodivých artérií.....	62
5.2.4. Změny v procentuálním zastoupení “Double laminated vessels“.....	70
5.2.5. Změny v distribuci toluidinovou modří detekovatelných žírných buněk.....	71
5.2.6. Změny v distribuci matrix metaloproteináza 13 pozitivních žírných buněk.....	72
5.2.7. Morfometrické změny pravé komory srdeční.....	73
5.2.8. Změny ve výsledné hmotnosti potkanů.....	74

6. DISKUZE	75
6.1. Vymezení zkoumané problematiky.....	75
6.2. Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4denní hypoxie.....	76
6.3. Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie.....	85
7. ZÁVĚR	89
8. SOUHRN	90
9. SUMMARY	91
10. LITERATURA	92
11. SEZNAM PUBLIKACÍ	96
11.1 Publikace s IF vztahující se k tématu dizertace	96
11.2 Publikace s IF nevztahující se k tématu dizertace	96
11.3 Kapitoly v monografiích	96

POUŽITÉ ZKRATKY:

MMP13	matrix-metaloproteináza 13
MMP13MC	žírné buňky detekovatelné anti-MMP13
TBDMC	žírné buňky detekovatelné toluidinovou modří
DLV	“Double-laminated vessels”
IHCH	imunohistochemie
PDGF	platelet-derived growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
TGF β	transforming growth factor β
bFGF	basic fibroblast growth factor

1. ÚVOD

Prostředí se sníženým obsahem kyslíku navozuje u potkana rozvoj hypoxické plicní hypertenze nejprve v důsledku hypoxické plicní vasokonstrikce s následnou remodelací plicního cévního řečiště. Vlivem nárůstu arteriálního krevního tlaku v plicním oběhu dochází následně ke kompenzatorní hypertrofii pravé komory srdeční. V průběhu působení hypoxie na plicní tkáň pozorujeme redistribuci žírných buněk ve stěně plicních artérií a současně změnu kvality a kvantity jejich sekrečních produktů. Tyto změny žírných buněk probíhají v hypoxii současně s remodelačními změnami zmíněných cév. Mezi remodelační změny patří zejména neomuskularizace nejmenších prealveolárních artérií a hypertrofie tunica media větších artérií. Další změny se pak odehrávají ve změně struktury složek mezibuněčné hmoty. Protože jsou žírné buňky zdrojem řady enzymů a biologicky aktivních látek, jsou považovány za významného činitele v procesu rozvoje morfologického obrazu hypoxické plicní hypertenze. Efektivní stabilizace granul žírných buněk by tedy měla vést k omezení remodelačních změn plicních artérií, k omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze, a tím sekundárně k omezení negativního dopadu na srdce, zejména pak k omezení hypertrofie pravé komory srdeční. V průběhu studie jsme chtěli detailně zmapovat hlavní morfologické parametry přestavbových změn plicních artérií a dále charakter odlišnosti těchto remodelací při funkčně efektivní terapii kromoglykátém sodným. Přestože se jedná o téma již obsáhle probádané, věříme, že přispějeme k dalšímu posunutí neomezených hranic poznání bazálního výzkumu morfologických změn kardiopulmonálního cévního řečiště za experimentálních podmínek. Práce morfologicky navazuje na rozsáhlou práci týmu prof. Hergeta a prof. Hampla Ústavu fyziologie 2. lékařské fakulty v Praze, který se tímto tématem zabývá již dlouhou

dobu a který verifikoval řadu dnes již všeobecně akceptovaných funkčních hypotéz tohoto tématu.

2. TEORETICKÉ ZÁKLADY

Plicní hypertenze je projevem řady heterogenních onemocnění, které ústí v remodelační změny plicních artérií. Této společné symptomatologie lze využít při výzkumu, kdy základní patomorfologická remodelace kardiopulmonálního řečiště je společným parametrem řady patologických stavů (Dorfmüller et al., 2012). Klasifikace plicní hypertenze je vzhledem k velké různorodosti vyvolávajících onemocnění složitá a byla v průběhu posledních desetiletí již několikrát pozměněna. V současné době je platné rozdělení, ustanovené v roce 2008 (4th World Symposium On Pulmonary Hypertension, 2008, Dana Point, California, USA), které klasifikuje onemocnění vyvolávající plicní hypertenzi do 5 skupin:

1. skupina - Plicní arteriální hypertenze
2. skupina - Plicní hypertenze vzniklá v důsledku onemocnění levého srdce
3. skupina - Plicní hypertenze vzniklá v důsledku plicního onemocnění či hypoxie
4. skupina - Chronická trombembolická plicní hypertenze
5. skupina - Plicní hypertenze s nejasnou multifaktoriální etiologií vzniku

(Simonneau et al., 2013).

V oblasti výzkumu plicní hypertenze existuje řada možných zvířecích modelů a jejich použití (Stenmark et al., 2009). V našem experimentu remodelačních změn plicních artérií a srdce jsme použili model hypoxické plicní hypertenze u potkana, který byl

mnoha předchozími pracemi v oboru odzkoušen jako funkční (Hislop et al., 1976; Williams et al., 1977).

Prostředí se sníženým obsahem kyslíku indukuje plicní arteriální remodelace, které ústí v rozvoj plicní hypertenze. Mnoho z těchto změn se odehrává v prvních 2 týdnech expozice hypoxii, kdy se v plicní tkáni uplatňuje řada patologických drah, jako je produkce peroxidu vodíku alveolárními makrofágy, způsobující poškozování plicních artérií (Wilhelm et al., 2003), produkce intersticiální kolagenázy – matrix-metaloproteinázy 13 (MMP-13) plicními žírnými buňkami vedoucí ke štěpení nativních kolagenů, zejména kolagenu typu I. Tyto štěpy dále vedou ke stimulaci fibroblastů a hladkých svalových buněk k proliferaci a produkci mezibuněčné hmoty (Gardi et al., 1994). Produkce těchto nízkomolekulárních štěpů kolagenu se odehrává již v časných fázích expozice hypoxii a má pravděpodobně klíčovou úlohu v rozvoji remodelace (Novotná et al., 2002). Expozice hypoxii je dále spojena s produkcí faktorů, jako je PDGF (Dahal et al., 2011) nebo HIF-1 α , který přímo indukuje produkci VEGF a erythropoietinu (Voelkel et al., 2000). Uplatňuje se zde dále řada hypoxií indukovaných faktorů, které ovlivňují výsledné remodelační změny plicních artérií (Rose et al., 2002; Feltis et al., 2007; Ball et al., 2014). Vzhledem k poznatku, že při omezení aktivity MMP-13 dochází k redukci remodelace plicních artérií až o 50 % (Herget et al., 2003), považuje se právě tento faktor za určující v indukci remodelačních změn.

Žírné buňky produkující MMP-13 byly nalezeny v tunica adventitia odporových plicních artérií, zejména pak v iniciálních fázích expozice hypoxii (Vajner et al., 2006). Produkce MMP-13 žírnými buňkami po expozici hypoxii byla prokázána i in vitro

(Maxová et al., 2002; Maxová et al., 2010). Dále byla potvrzena hypotéza, že terapie kromoglykátém sodným jakožto stabilizátorem žírných buněk proti degranulaci omezuje rozvoj hypoxické plicní hypertenze (Baňasová et. al., 2008; Maxová et. al., 2010). Cílem naší práce tedy bylo morfologicky kvalitativně a kvantitativně popsat změny plicních artérií a srdce v průběhu hypoxie při současné terapii kromoglykátém sodným, který cestou stabilizace žírných buněk vede k omezení rozvoje hypoxické plicní hypertenze (Herget et al., 2003).

Hypertrofie pravé komory srdeční je sekundárním kompenzatorním projevem srdečního svalu na zvýšený odpor plicního arteriálního řečiště. Tyto změny způsobují dysfunkci pravé komory, a tím výrazně zvyšují morbiditu a mortalitu pacientů s hypoxickou plicní hypertenzí (Bartelds et al., 2016). Hlavní projevy plicní hypertenze na srdci vznikají v důsledku kompenzace omezení srdečního výdeje vzestupem tlaku v malém oběhu. Současně s hypertrofií pravé komory dochází také k postupnému nárůstu kontraktility tak, aby byl zachován srdeční výdej pro potřeby organismu. Postupné selhání této homeometrické funkční adaptace ústí v patologickou heterometrickou adaptaci srdce a s tím související postupné srdeční selhávání. To charakterizuje postupně se snižující srdeční výdej, narušené plnění levé komory a síně, následné snížení kontraktility myokardu pravé komory a tím postupné snížení fyzické kondice pacienta (Naeije et al., 2014; Pinsky, 2016). Hypertrofii pravé komory srdeční lze tedy v průběhu pokusu hypoxické plicní hypertenze předpokládat a její kvantifikaci je tedy možné použít jako dobrý indikátor efektivity navození experimentální hypoxické plicní hypertenze a také jako indikátor efektivity její terapie.

3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

3.1 Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4denní hypoxie

Podle současného stavu poznání vede již několikadenní expozice prostředí se sníženým obsahem kyslíku k zásadním morfologickým a funkčním změnám kardiopulmonálního krevního řečiště. Tyto iniciační změny se zdají být určující pro další postup reaktivity plicních artérií a srdce na změnu zevního prostředí. Terapie kromoglykátlem sodným by měla tyto změny morfologicky modifikovat.

Hypotézy:

1. 4denní hypoxie indukuje hypoxickou remodelaci plicních artérií, která je dostatečná pro rozvoj hypoxické plicní hypertenze, a tím pro rozvoj hypertrofie pravé komory srdeční potkana.
2. Efektivní stabilizace žírných buněk proti degranulaci v průběhu 4denní hypoxie omezuje rozvoj morfologických přestaveb plicních artérií, a tím také rozvoj funkčních následků hypoxické plicní hypertenze v podobě hypertrofie pravé komory srdeční potkana.
3. Omezení sekreční aktivity žírných buněk vede ke změnám složek mezibuněčné hmoty plicních artérií potkana jak v průběhu 4denní hypoxické arteriální remodelace, tak v prostředí s obvyklým obsahem kyslíku – normoxie.

Cíle práce:

1. Základní kvalitativní posouzení jednotlivých kategorií plicních artérií potkana jak v průběhu 4denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným.
2. Kvantifikace morfologických změn plicních artérií a srdce potkana jak v průběhu 4denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným.
3. Kvantifikace změn v distribuci žírných buněk detekovatelných toluidinovou modří a žírných buněk MMP-13 pozitivních ve stěně jednotlivých kategorií plicních artérií potkana jak v průběhu 4denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným.

3.2 Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie

Jestliže 4denní hypoxie vede k iniciaci rozvoje morfologického obrazu hypoxické plicní remodelace, považujeme 21denní experiment u potkana za dostatečný pro rozvoj definitivní morfologické odpovědi plicních artérií na hypoxii. První dny kontinuální hypoxické expozice se zdají být pro následující morfologické remodelace dlouhodobého pokusu určující, proto by měla iniciální terapie kromoglykátlem sodným tento rozvoj modifikovat.

Hypotézy:

1. 21denní hypoxie vede k rozvoji definitivní hypoxické remodelace plicních artérií, která ústí v další progresi hypoxické plicní hypertenze, a tím v progresi hypertrofie pravé komory srdeční potkana.
2. Efektivní stabilizace žírných buněk proti degranulaci v průběhu prvních 4 dnů 21denní hypoxie modifikuje výsledný morfologický obraz hypoxické remodelace jednotlivých kategorií plicních artérií potkana.
3. Omezení sekreční aktivity žírných buněk v posledních 4 dnech 21denní hypoxie nebude mít vzhledem k již nastavenému trendu hypoxické remodelace vliv na výslednou morfologii plicních artérií potkana.

Cíle práce:

1. Základní kvalitativní posouzení jednotlivých kategorií plicních artérií potkana jak v průběhu 21denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným v prvních nebo posledních 4 dnech pokusu.
2. Kvantifikace morfologických změn plicních artérií a srdce potkana jak v průběhu 21denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným v prvních nebo posledních 4 dnech pokusu.
3. Kvantifikace změn v distribuci toluidinovou modří detekovatelných žírných buněk a MMP-13 pozitivních žírných buněk ve stěně jednotlivých kategorií plicních artérií potkana jak v průběhu 21denní hypoxie, tak při současné terapii kromoglykátém sodným v prvních nebo posledních 4 dnech pokusu.

4. METODIKA

4.1. Rozdělení experimentálních zvířat do pokusných skupin

Pro experiment jsme použili samce potkana kmene Han Whistar (BioTest Ltd., Konárovice, Česká republika), kteří byli po 8 jedincích náhodně rozděleni do 9 pokusných skupin. Byly to skupiny kontrolní, které byly ponechány v normoxickém a normobarickém prostředí bez další terapie po dobu 4 dní (skupina N4) a 21 dní (skupina N21), skupiny vystavené normobarické hypoxii (10% O₂) po dobu 4 dní bez další terapie (skupina H4) a po dobu 21 dní bez další terapie (skupina H21), skupiny vystavené normobarické hypoxii se současnou terapií kromoglykátém sodným (40 mg/kg ž.h., i.p. 1x1; C0399, Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) po dobu 4denního pokusu (skupina H4K), v prvních 4 dnech 21denního pokusu (skupina H21KZ) a v posledních 4 dnech 21denního pokusu (H21KK) a nakonec skupiny kontrolní normoxické s terapií kromoglykátém sodným v průběhu 4denního pokusu (N4K) a v prvních 4 dnech 21denního pokusu (skupina N21KZ). Pro experiment 4denní hypoxie byly použity skupiny N4, N4K, H4 a H4K, pro experiment 21denní hypoxie byly použity skupiny N21, N21KZ, H21, H21KZ a H21KK. Pro přehlednost rozdělení jednotlivých skupin slouží tabulka 1.

Název skupiny	Popis skupiny	Trvání pokusu
N4	Normoxická kontrolní skupina bez další terapie po dobu 4 dní	4 dny
H4	Skupina vystavená 4denní hypoxii bez další terapie	4 dny
N4K	Normoxická kontrolní skupina s terapií kromoglykátém sodným v průběhu 4denního pokusu	4 dny
H4K	Skupina vystavená 4denní hypoxii s terapií kromoglykátém sodným v průběhu pokusu	4 dny
N21	Normoxická kontrolní skupina bez další terapie po dobu 21 dní	21 dní
H21	Skupina vystavená 21denní hypoxii bez další terapie	21 dní
N21KZ	Normoxická kontrolní skupina s terapií kromoglykátém sodným v prvních 4 dnech 21denního pokusu	21 dní
H21KZ	Skupina vystavená 21denní hypoxii s terapií kromoglykátém sodným v prvních 4 dnech pokusu	21 dní
H21KK	Skupina vystavená 21denní hypoxii s terapií kromoglykátém sodným v posledních 4 dnech pokusu	21 dní

Tab. 1: Rozdělení experimentálních skupin potkanů v průběhu pokusu.

Hypoxické prostředí normobarické kontinuální hypoxie (10% O₂) jsme navozovali v hypoxické komoře Oddělení vývojové kardiologie Akademie věd České republiky (Fyziologický ústav AV ČR, Praha, Česká republika). Záznam o kvalitě prostředí v hypoxické komoře byl kontinuálně monitorován a zaznamenáván počítačem. Použili jsme standardní dietu pokusných potkanů s neomezenou dostupností vody. Každý den pak byla zajišťována péče o potkany s výměnou vody a podestýlky. První a poslední den pokusu byli potkani zváženi. Poslední den experimentu byli potkani uvedeni do celkové anestézie thiopentalem sodným (40 mg/kg ž.h., i.p.; VÚAB Pharma a.s., Roztoky, Česká republika) a poté byli usmrceni instrumentálním přerušením krční páteře. Experimenty se řídily směrnicemi Evropského společenství a NIH pro používání pokusných zvířat. Projekt pokusu byl schválen Odbornou komisí

pro ochranu laboratorních zvířat na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Všichni experimentátoři získali kvalifikaci a odbornou způsobilost na úseku pokusných zvířat podle §15d, odstavce 2, písmeno a) zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění (navrhování pokusů a projektů pokusů pro lékaře, veterinární lékaře a osoby s jiným vysokoškolským vzděláním biologického oboru) na České zemědělské univerzitě v Praze.

4.2. Histologické techniky nekroptických vzorků

4.2.1. Odběr, základní histologické zpracování vzorků

Po usmrcení potkanů byl pitvou preparován komplex srdce a plíce, který byl fixován pro další histologické zpracování v Bakerově tekutině (40% formaldehyd 100 ml, destilovaná voda 900 ml, CaCl₂ 20 g). Provedli jsme přikrojení levé plíce podélně v sagitální rovině a pravé plíce transversálně v úrovni hilu. Srdce jsme přikrojili Šiklovým řezem v úrovni komor distálně bezprostředně pod atrioventrikulárním přechodem. Vzorky byly zality do parafinu a paralelní řezy byly krájeny o tloušťce 5 μm.

4.2.2. Základní barvení

Pro přehledné barvení preparátů plic a srdce jsme použili hematoxylin-eosin. Jako selektivní barvení jsme použili orcein k identifikaci elastických vláken a membrán, barvení podle van Giesona k identifikaci kolagenních vláken (kolagen typu I), toluidinovou modř k zobrazení granul žírných buněk, a tím tedy toluidinovou modří

detekovatelných žírných buněk (TBDMC), a impregnaci podle Gomoriho k identifikaci retikulárních vláken (kolagenu typu III).

4.2.3. Imunohistochemický průkaz matrix metaloproteinázy 13

Produkce a akumulace MMP-13 v granulech žírných buněk byla identifikována imunohistochemicky (IHCH). Tak byly detekovány MMP-13 pozitivní žírné buňky (MMP13MC). Revitalizaci antigenu na deparafinovaných a rehydratovaných řezech jsme provedli jejich koupelí v citrátovém pufru při teplotě 96°C po dobu 15 minut. Jako primární jsme užili králičí polyklonální protilátku anti-MMP-13 (ab75606, Abcam plc., Cambridge, UK) ředěnou v poměru 1:200 roztokem na ředění protilátek (ab64211, Abcam). Inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. K blokování endogenních enzymů, pozadí a reakci se sekundární protilátkou jsme použili vizualizační kit (EXPOSE rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit, ab94726, Abcam). Řezy byly dobarveny hematoxylinem a montovány do Solakrylu BMX.

4.2.4. Imunohistochemický průkaz kolagenu typu VI

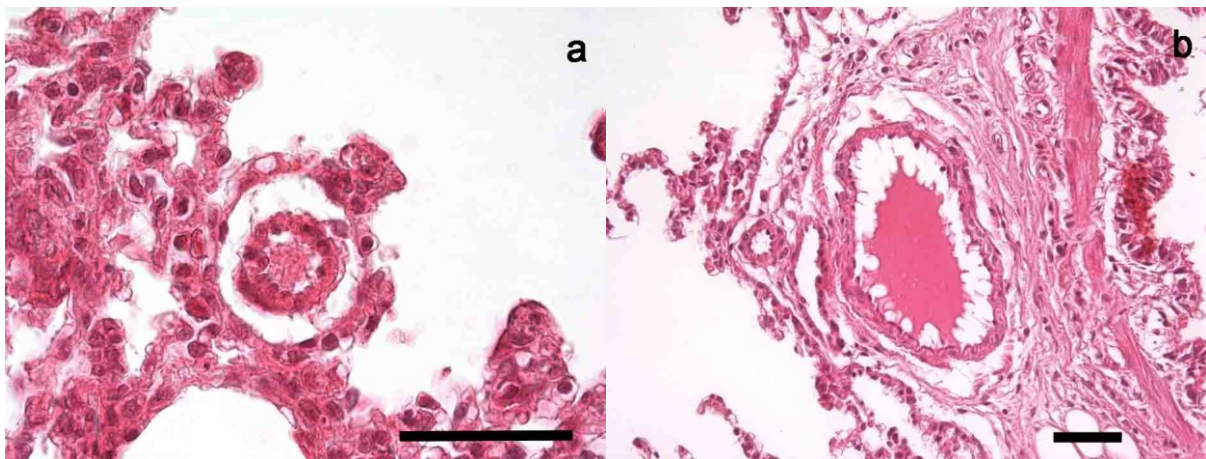
Produkce a změny v distribuci kolagenu VI v okolí plicních artérií byly vizualizovány s použitím IHCH. Revitalizaci antigenu jsme provedli koupelí deparafinovaných a rehydratovaných řezů v citrátovém pufru při teplotě 96°C po dobu 15 minut. K detekci jsme použili králičí polyklonální protilátku anti-collagen VI (ab6588, Abcam plc., Cambridge, UK) v roztoku na ředění protilátky (ab64211, Abcam). Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:200 a inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. K blokování endogenních enzymů, pozadí a reakci se sekundární protilátkou jsme

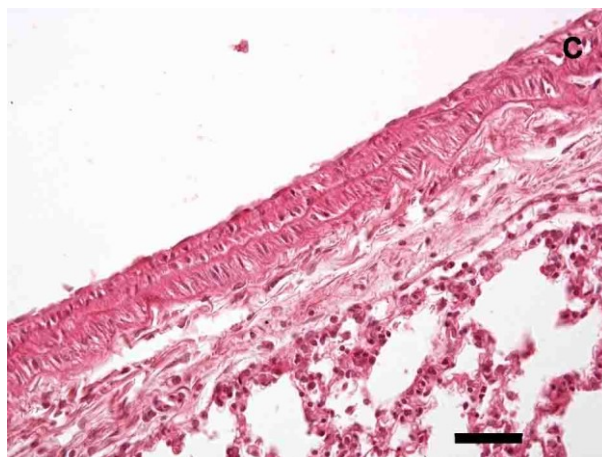
použili vizualizační kit (EXPOSE rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit, ab94726, Abcam). Preparáty byly dobarveny hematoxylinem a montovány do Solakrylu BMX.

4.3. Metodika kvalitativního a kvantitativního posouzení preparátů

4.3.1. Kategorizace plicních artérií

V plicním parenchymu potkana jsme rozlišovali tři kategorie artérií. Prealveolární plicní artérie s průměrem lumina mezi 10–30 μm (Obr. 1a), osvalené periferní artérie s průměrem lumina mezi 30–100 μm (Obr. 1b) a velké vodivé artérie s průměrem lumina nad 100 μm (Obr. 1c). Prealveolární artérie tvoří dohromady se skupinou osvalených periferních artérií skupinu tzv. odporových artérií, které hrají pravděpodobně dominantní roli v utváření výsledného plicního arteriálního tlaku.

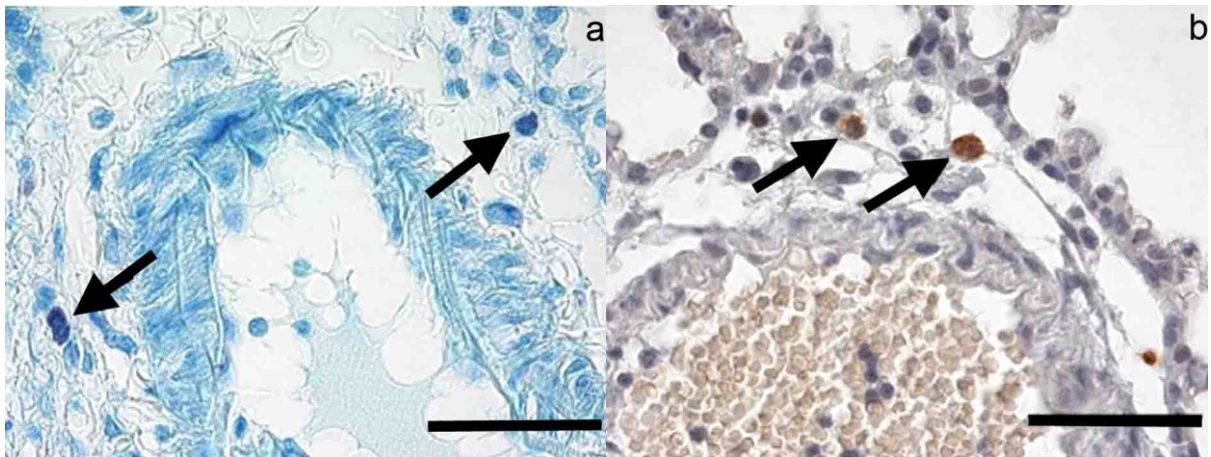




Obr. 1: Jednotlivé kategorie plicních artérií potkana. Barvení Hematoxylin-eosin. a) Prealveolární artérie (Ø 10–30 μm) (měřítko = 20 μm), b) Osvalené periferní artérie (Ø 50–100 μm) (měřítko = 50 μm), Centrální vodivé artérie (Ø > 100 μm) (měřítko = 50 μm).

4.3.2. Kvantifikace změn v distribuci periarteriálních žírných buněk

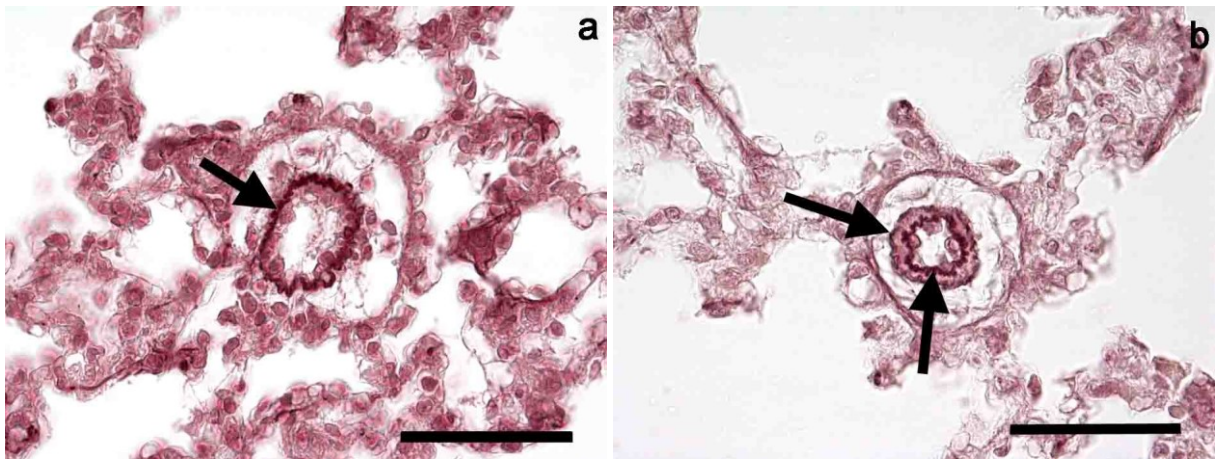
Kvantifikace změn v distribuci periarteriálních žírných buněk byla prováděna jednak při selektivním barvení toluidinovou modří, kdy se jejich granula barví metachromaticky červenofialově (Obr. 2a), jednak použitím IHCH proti intersticiální kolagenáze (u potkana MMP-13), která je obsažena v granulech periarteriálních žírných buněk (Obr. 2b). Za pozitivní nález žírných buněk byly považovány buňky obsahující granula – tedy buňky nedegranulované. Degranulované žírné buňky započítávány nebyly. Kvantifikace byla prováděna s pomocí analyzátoru obrazu NIS Elements 3.0 AR (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Česká republika), který jsme použili spolu s motorizovaným stolcem mikroskopu k nasnímání a následně změření přesné plochy odečítaného plicního preparátu. Dále jsme do nasnímaného obrazu vkládali informaci o lokalizaci a počtu identifikovaných žírných buněk ve stěně příslušné kategorie plicních artérií. Výsledný počet žírných buněk byl pak přepočítán na plochu 1 cm^2 řezu. Metodika byla odvozena od předchozí práce mého školitele (Vajner et al., 2006).



Obr. 2: Identifikace periarteriálních žírných buněk pomocí identifikace jejich granul a) toluidinovou modří, b) IHCH anti-MMP13. (měřítko = 20 μ m).

4.3.3. Kvantifikace “Double laminated vessels“

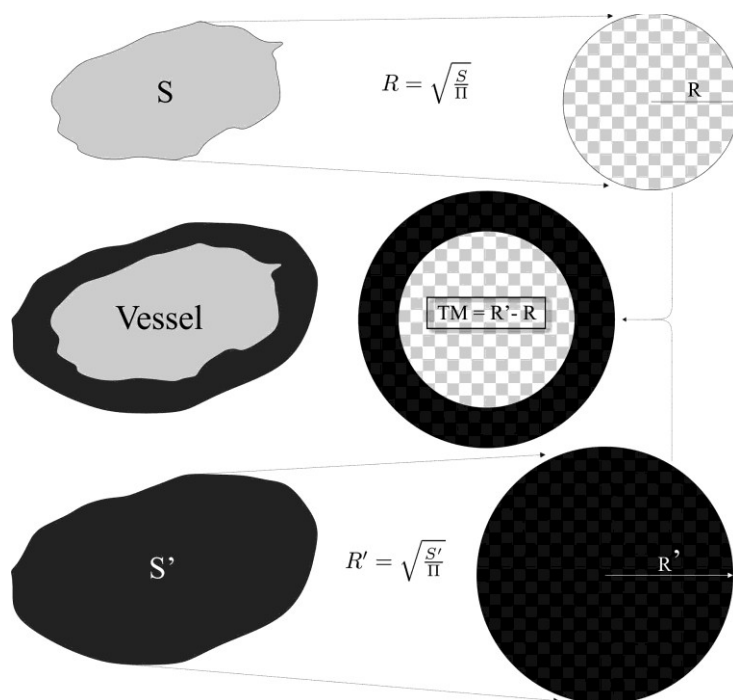
Pro posouzení intenzity hypoxické remodelace plicních artérií jsme použili metodu kvantifikace změny v procentuálním zastoupení “double-laminated vessels” (DLV). Za DLV byly považovány odporové artérie, u kterých byla membrana elastica externa utvořena na více než polovině obvodu (Obr. 3). Elastické membrány byly identifikovány orceinem. Procentuální zastoupení artérií bylo hodnoceno po přepočtu na 1 cm² plochy řezu. Metodika byla odvozena z předchozích prací v tomto oboru (Leach et al., 1977, Herget et al., 1978).



Obr. 3: Metodika identifikace "Double-laminated vessels" při přítomnosti membrana elastica externa na více než polovině obvodu odporové artérie. Prealveolární artérie. Orcein. a) "Single-laminated vessel, b) "Double-laminated vessel. (měřítko = 20 μ m).

4.3.4. Metodika plošných měření tloušťky vrstev stěny velkých vodivých artérií a myokardu pravé komory srdce pomocí analyzátoru obrazu

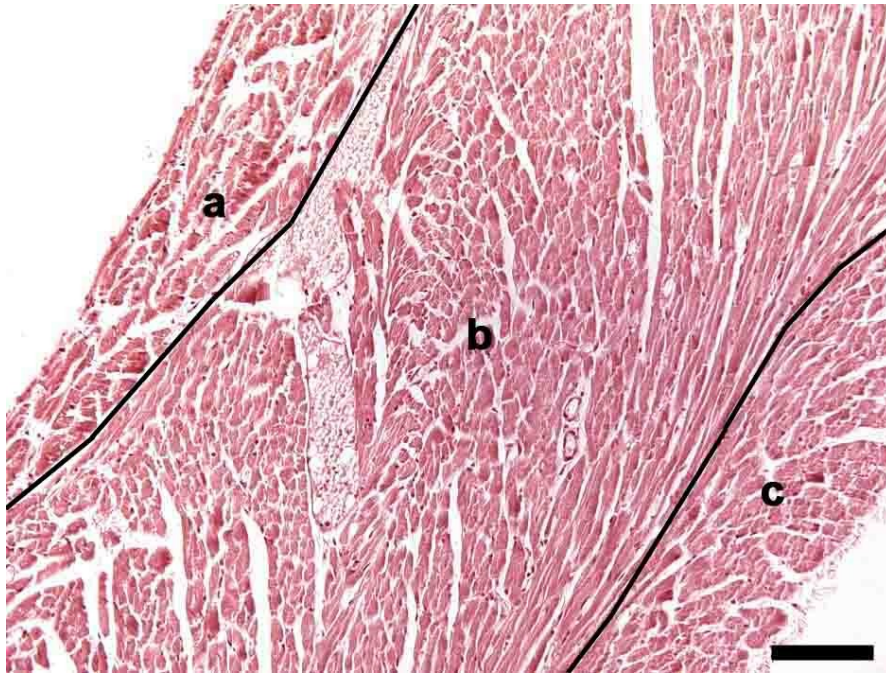
K plošným měřením struktur preparátů plic a srdce potkana jsme použili analyzátor obrazu NIS Elements 3.0 AR (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Česká republika). Nejprve jsme provedli s užitím motorizovaného stolku nasnímání celého preparátu, dále jsme pomocí funkce manuálního vymezení plochy definovali okraje požadované struktury a software tuto plochu změřil. Aplikaci jsme použili na měření plochy a tloušťky tunica media a tunica adventitia u centrálních vodivých artérií plic a dále k měření tloušťky myokardu pravé komory srdce. Postupovali jsme podle námi navrženého předpokladu, že i nepravidelně ohraničenou plochu si lze představit tak, že patří kruhu, jemuž lze zpětně vypočítat poloměr. Pokud jsme těchto "kruhů" vytvořili koncentricky více (lumen, tunica media, tunica adventitia), následným odečtem jejich poloměrů jsme získali průměrnou tloušťku tunica media, tunica adventitia a myokardu (Obr. 4).



Obr. 4: Schéma měření tloušťky podvrstev luminizovaných struktur u centrálních vodivých artérií plic a myokardu srdce potkana na základě zpětného odečtu nepravidelných ploch a zpětného výpočtu poloměru.

4.3.5. Metodika měření průměrné tloušťky kardiomyocytů jednotlivých podvrstev myokardu pomocí analyzátoru obrazu.

V kategorizaci podvrstev myokardu pravé komory srdce potkana a metodice měření tloušťky kardiomyocytů jsme vycházeli z metodiky práce Campbella a spol. (1991). Ten stanovuje vrstvu endomyokardia, mesomyokardia a epimyokardia (Obr. 5). Průměrná tloušťka kardiomyocytů jednotlivých podvrstev myokardu byla vypočtena podle metodiky práce Corna a spol. (Corno et al., 2004) jako průměrná hodnota měření tloušťky 60 kardiomyocytů na daném řezu. K morfometrii byl opět použit analyzátor obrazu NIS Elements 3.0 AR (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Česká republika).



Obr. 5: Znázornění jednotlivých vrstev myokardu pravé komory srdce potkana. Barvení hematoxylin-eosin (měřítko = 100 μ m). a) Endomyokard, b) Mesomyokard, c) Epimyokard.

4.3.5 Statistické zpracování výsledků

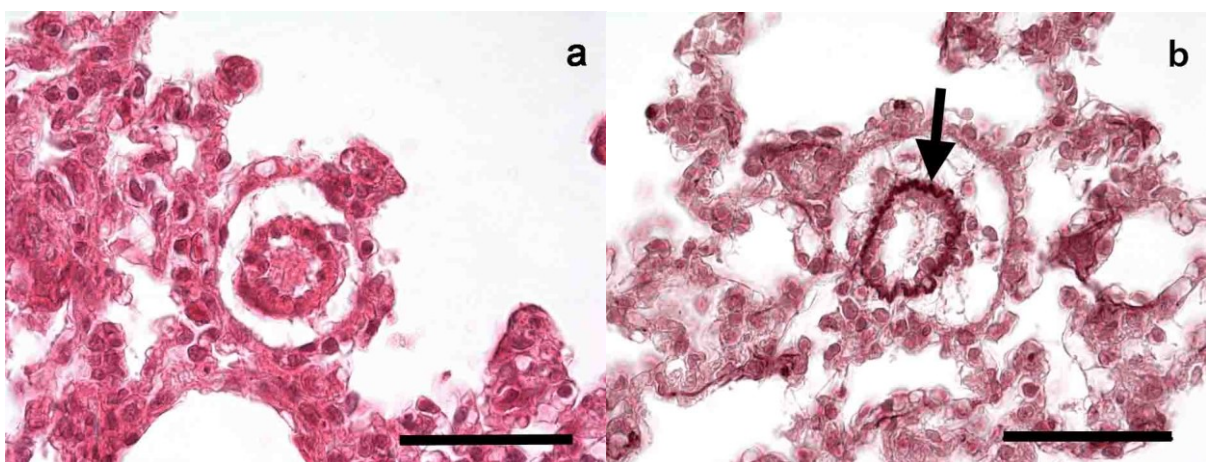
Statistická analýza byla provedena neparametrickou variantou analýzy rozptylu, Kruskalovým-Wallisovým testem, srovnávajícím více nezávislých skupin, s Bonferroniho korekcí (byla-li potřebná). Použili jsme program Statistica v.10 software (StatSoft, Inc., U.S.A.). Získaná data jsou prezentována jako mediány a IQR. Za signifikantní jsme považovali hodnoty $p < 0,05$.

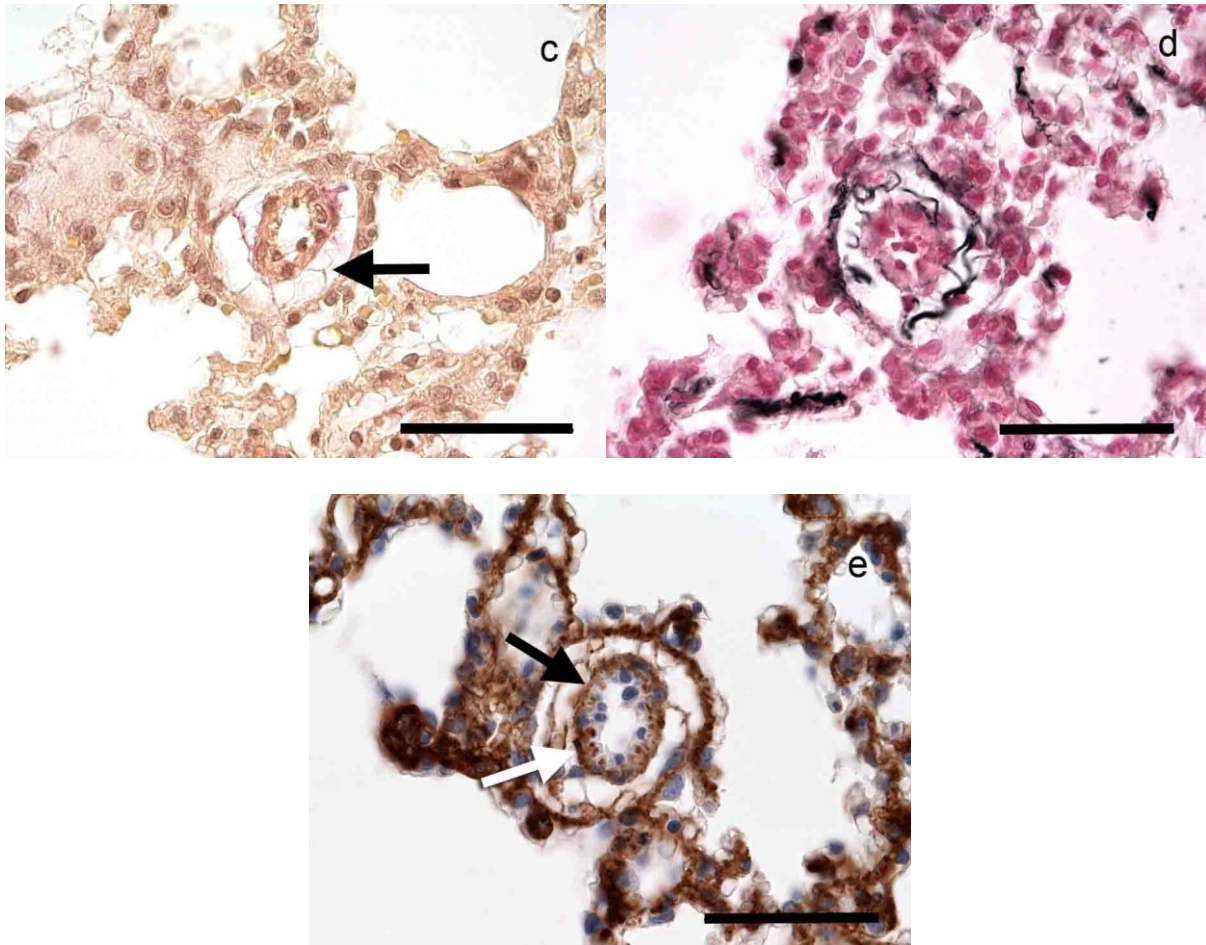
5. VÝSLEDKY

5.1. Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4 denní hypoxie

5.1.1. Morfologie prealveolárních artérií

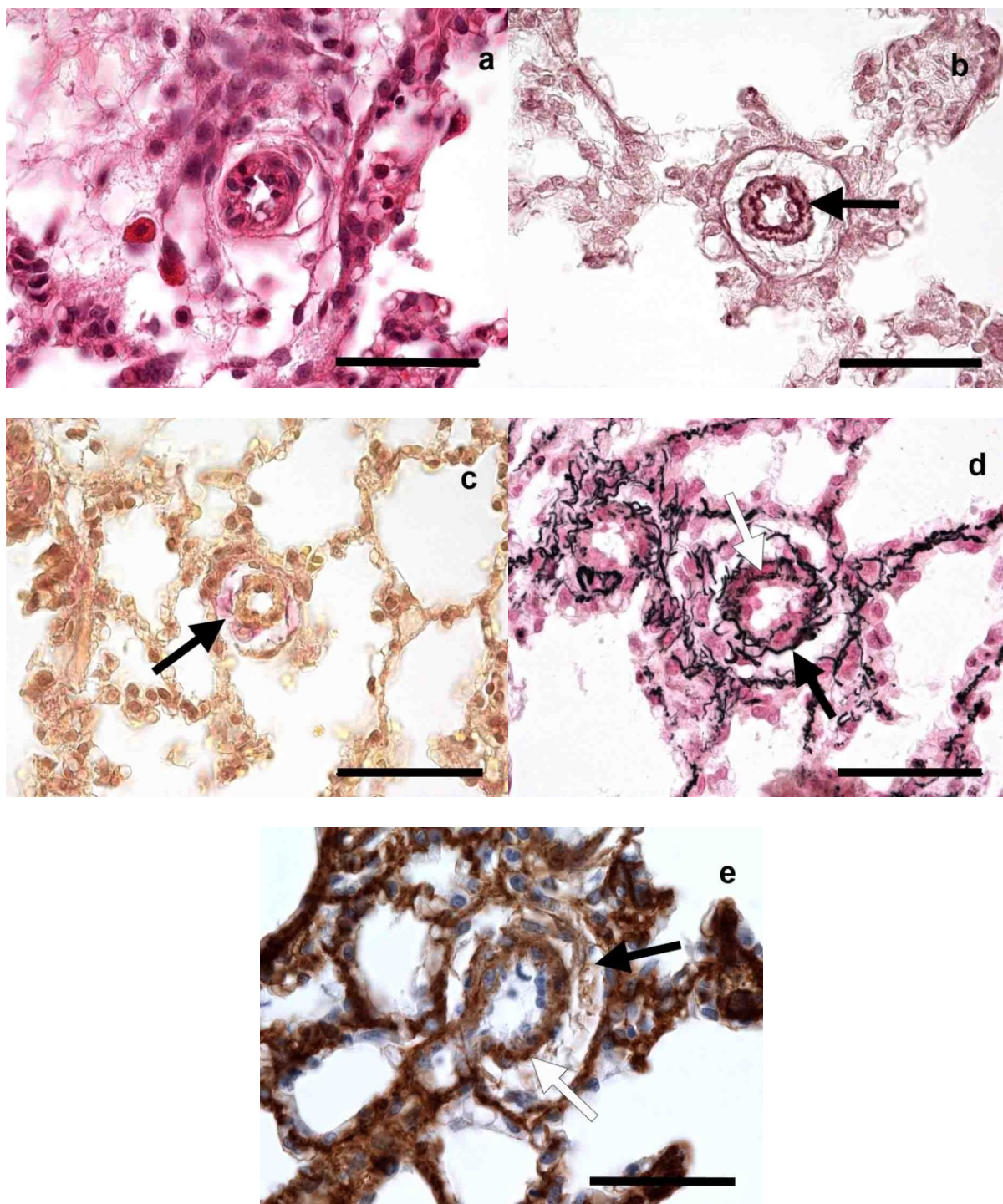
U skupiny N4 jsme zaznamenali prealveolární artérie s 1-2 vrstvami hladkých svalových buněk. Osvalení těchto artérií je symetrické (Obr. 6a). Vytvářejí pouze membrana elastica interna (Obr. 6b, černá šipka). V tunica adventitia prealveolárních artérií jsou ojedinělé fibroblasty, tenká vlákna kolagenu I (Obr. 6c, černá šipka) a vlákna retikulární (Obr. 6d). Cytoplasma fibroblastů je eosinofilní, jádra jeví převahu heterochromatinu. Pozitivitu kolagenu VI jsme zaznamenali v bazální membráně endotelových buněk (Obr. 6e, černá šipka), tato vrstva je nesouvislá. Pozitivitu jeví i endomysium hladkých svalových buněk (Obr. 6e, bílá šipka).





Obr. 6: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny N4. (měřítko = 20 μ m). a) hematoxylin-eosin, b) orcein, c) van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

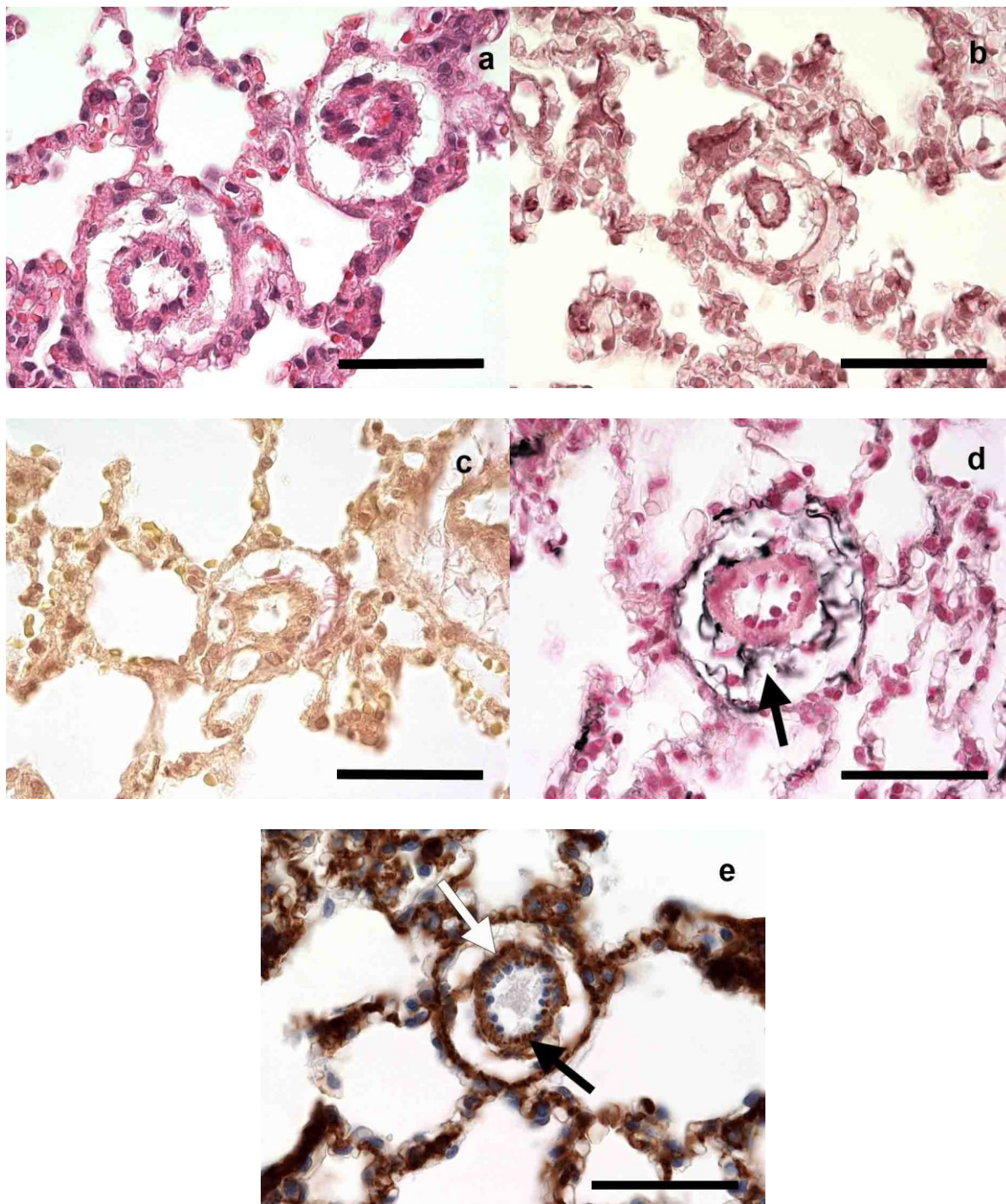
Prealveolární artérie skupiny H4 nesou známky probíhající hypoxické remodelace. Artérie jsou muskularizované s více než 3 vrstvami hladkých svalových buněk (Obr. 7a). Nacházíme častou formaci membrana elastica externa do obrazu DLV (Obr. 7b, černá šipka). Tunica adventitia obsahuje fibroblasty s basofilní cytoplasmou a s jádrem s převahou euchromatinu obklopené vlákny kolagenu I (Obr. 7c, černá šipka) a dále pak retikulární vlákna bez známek fragmentace (Obr. 7d, černá šipka). Retikulární vlákna obklopují také hladké svalové buňky tunica media (Obr. 7d, bílá šipka). Zaznamenali jsme pozitivitu kolagenu VI subendoteliálně a v tunica adventitia (Obr. 7e, černá šipka), dále pak výraznou pozitivitu v endomysiu (Obr. 7e, bílá šipka).



Obr. 7: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny H4. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

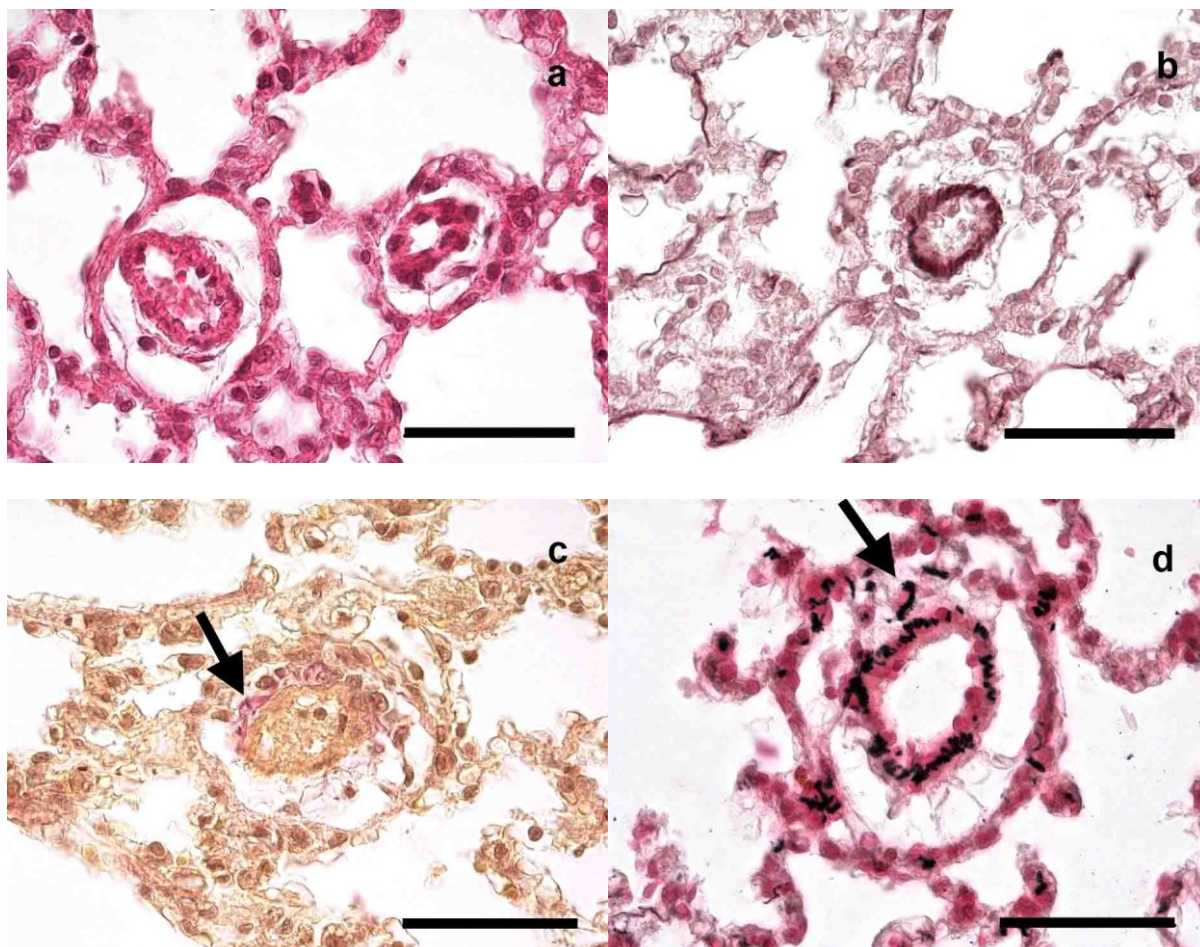
U skupiny N4K je morfologický nález obdobný jako u skupiny N4 (Obr. 8a,b,c) avšak s rozdílem nálezu známek fragmentace retikulárních vláken v tunica adventitia (Obr. 8d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI byla stejná jako u skupiny N4, tedy v bazální

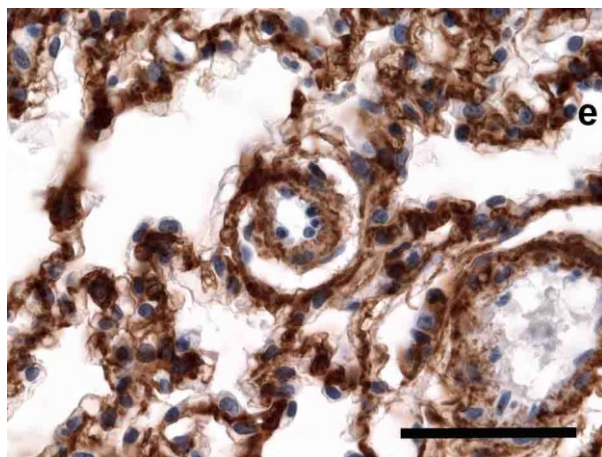
membráně pod endoteliemi (Obr. 8e, černá šipka) a v endomysiu (Obr. 8e, bílá šipka).



Obr. 8: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny N4K. (měřítko = 20 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Prealveolární artérie skupiny H4K mají fyziologickou úroveň osvalení v podobě 1-3 vrstev hladkých svalových buněk (Obr. 9a). Membrana elastica externa většinou není formována (Obr. 9b). V tunica adventitia přítomná vlákna kolagenu I jsou u této skupiny četnější a tlustší (Obr. 9c, černá šipka). Retikulární vlákna jsou tenká a fragmentovaná (Obr. 9d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI byla identická se skupinou N4 (Obr. 9e).

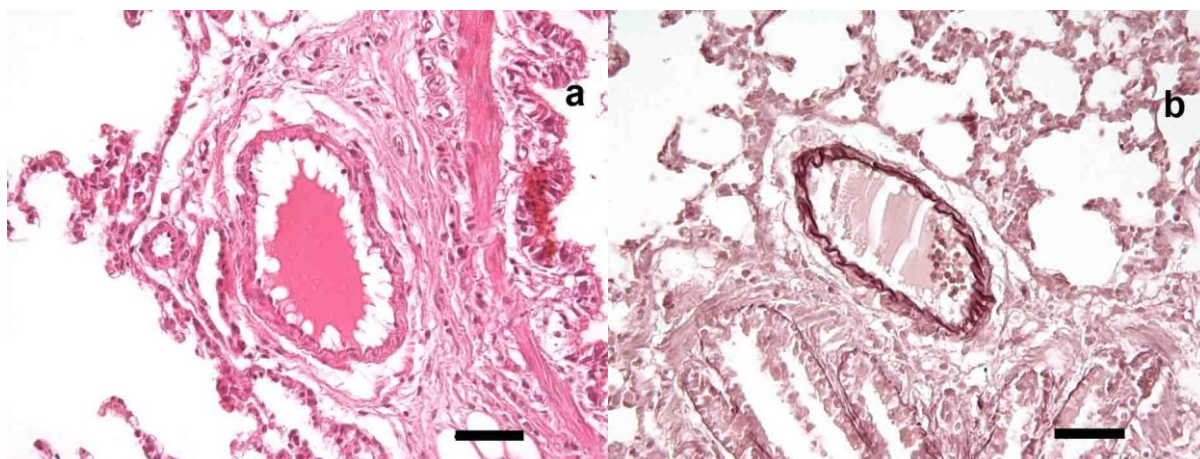


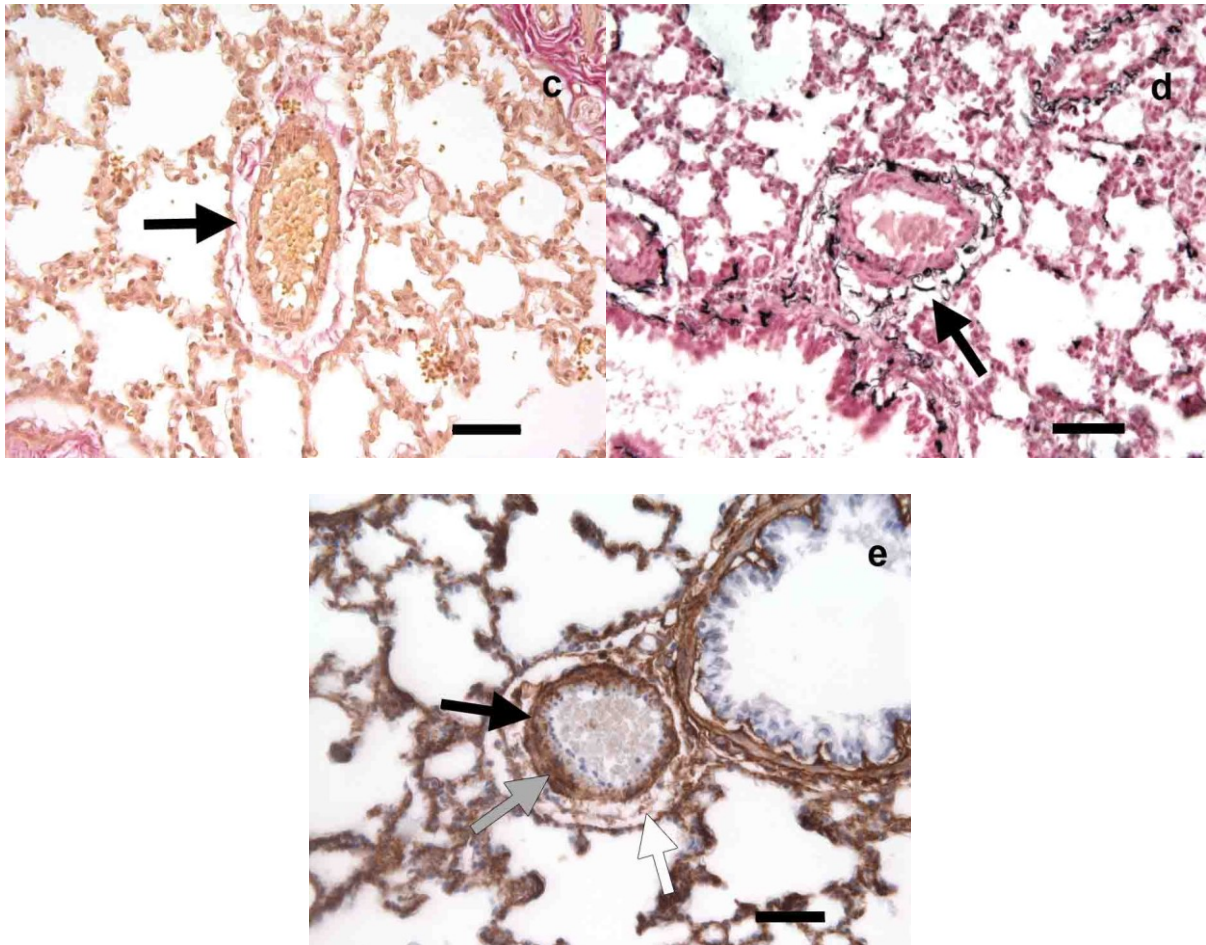


Obr. 9: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny H4K. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.”

5.1.2. Morfologie osvalených periferních artérií

Osvalené periferní artérie skupiny N4 jsou symetricky muskularizované s 4-5 vrstvami hladkých svalových buněk (Obr. 10a). Ojediněle tvoří pouze membrana elastica interna do obrazu “single laminated vessels“, většinou však odpovídají morfologické charakteristice DLV (Obr. 10b). Tunica adventitia obsahuje jemná vlákna kolagenu I (Obr. 10c, černá šipka) a vlákna retikulární (Obr. 10d, černá šipka), dále pak mezi vlákny longitudinálně uložené fibroblasty. Kolagen VI je pozitivní v rozsahu bazální membrány endotelií (Obr. 10e, černá šipka), dále pak v endomysiu (Obr. 10e, šedá šipka) a mírně v tunica adventitia (Obr. 10e, bílá šipka).

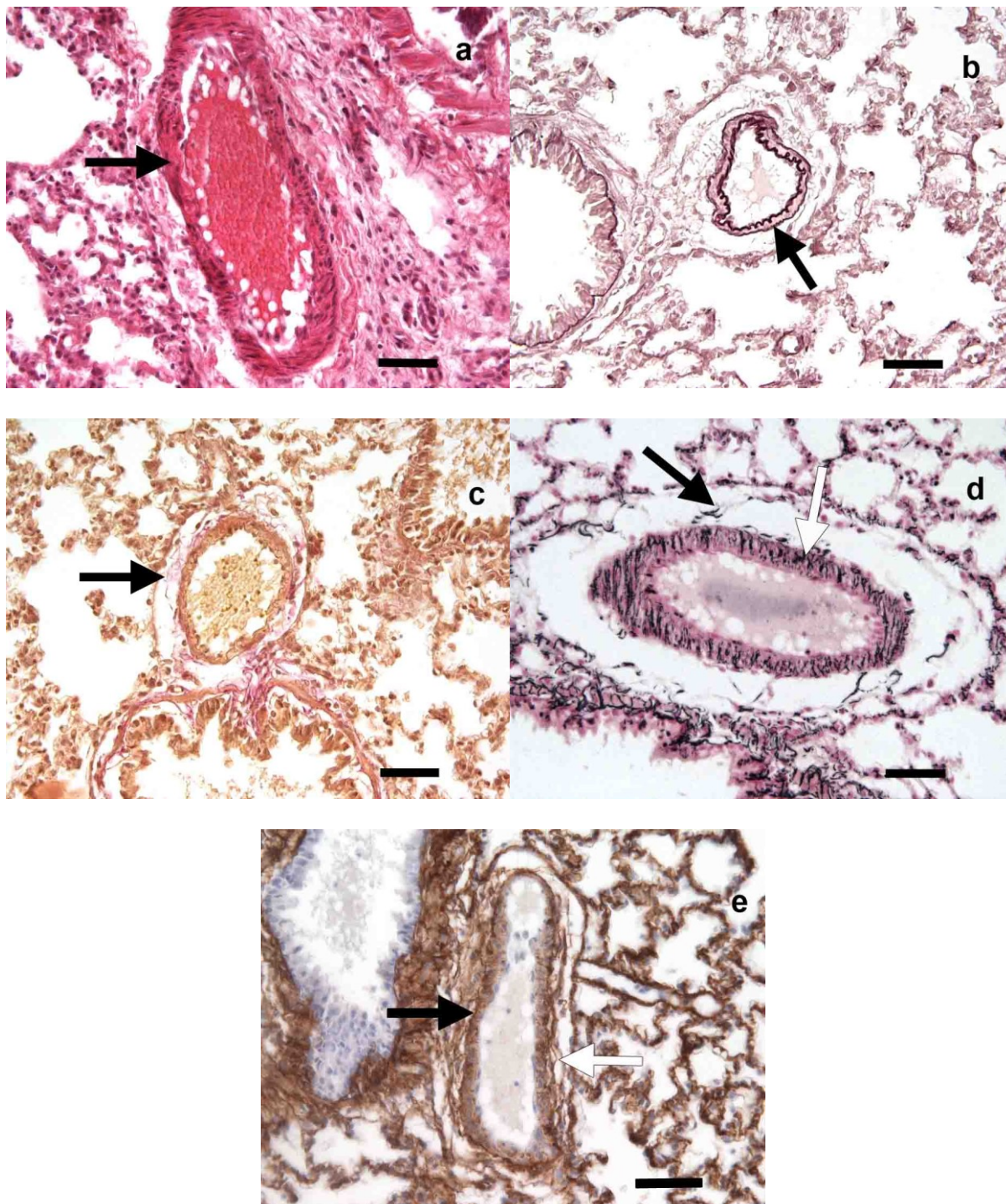




Obr. 10: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny N4. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

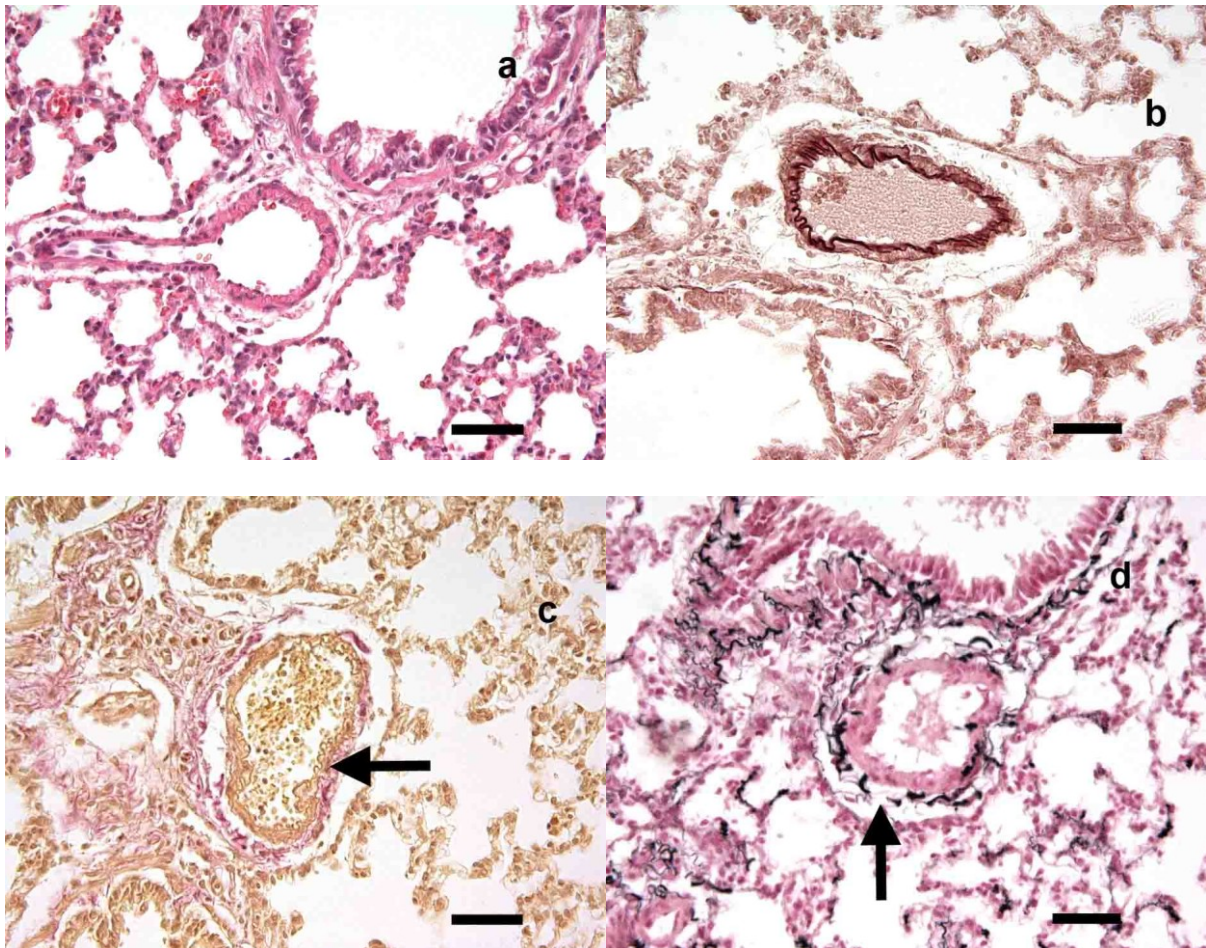
U skupiny H4 nacházíme osvalené periferní artérie se známkami iniciální asymetrické hypertrofie tunica media s obrazem formování tzv. šikmých segmentů (Obr. 11a, černá šipka). Téměř výlučně je formování membrana elastica externa, která spolu s již existující membrana elastica interna vytváří obraz DLV (Obr. 11b, černá šipka). Tunica adventitia obsahuje fibroblasty s basofilní cytoplasmou a s jádrem s převahou euchromatinu obklopené vlákny kolagenu I (Obr. 11c, černá šipka) a dále pak retikulární vlákna bez známek fragmentace (Obr. 11d, černá šipka). Retikulární vlákna obklopují také hladké svalové buňky tunica media (Obr. 11d, bílá šipka). Pozitivita kolagenu VI je v rozsahu endomysia pouze mírně, dále pak

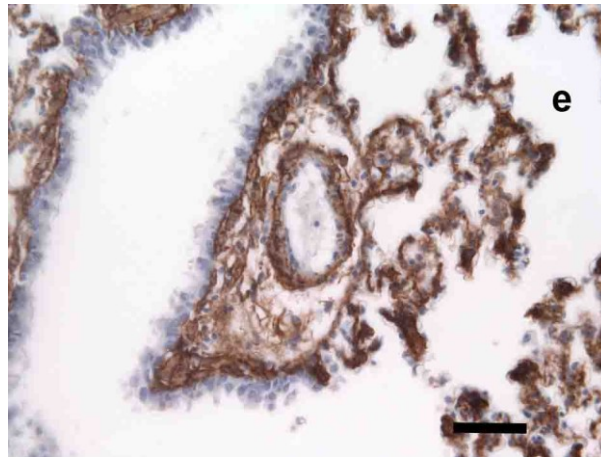
výrazněji na přechodu tunica media a tunica adventitia (Obr. 11e, černá šipka) a také v tunica adventitia (Obr. 11e, bílá šipka).



Obr. 11: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny H4. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

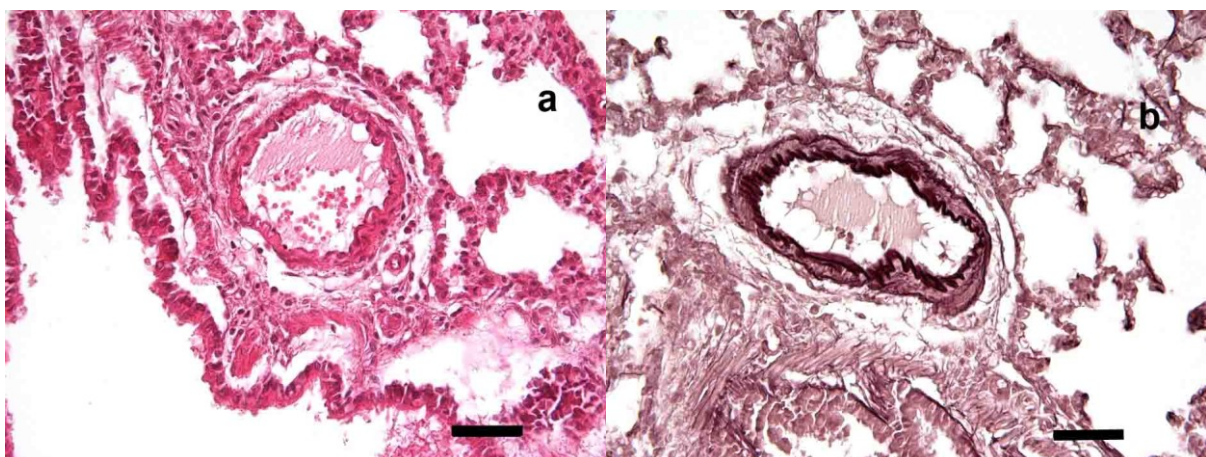
Základní morfologie osvalených periferních artérií u skupiny N4K je obdobná jako u skupiny N4 (Obr. 12a). Dominantně se také u této skupiny vyskytují artérie s obrazem DLV (Obr. 12b). U vláken kolagenu I jsme zaznamenali výraznější agregaci v místě přechodu tunica media a tunica adventitia (Obr. 12c, černá šipka). Specifická je morfologie retikulárních vláken v tunica adventitia, které vykazovaly známky fragmentace (Obr. 12d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI je stejná jako u skupiny N4 (Obr. 12e).

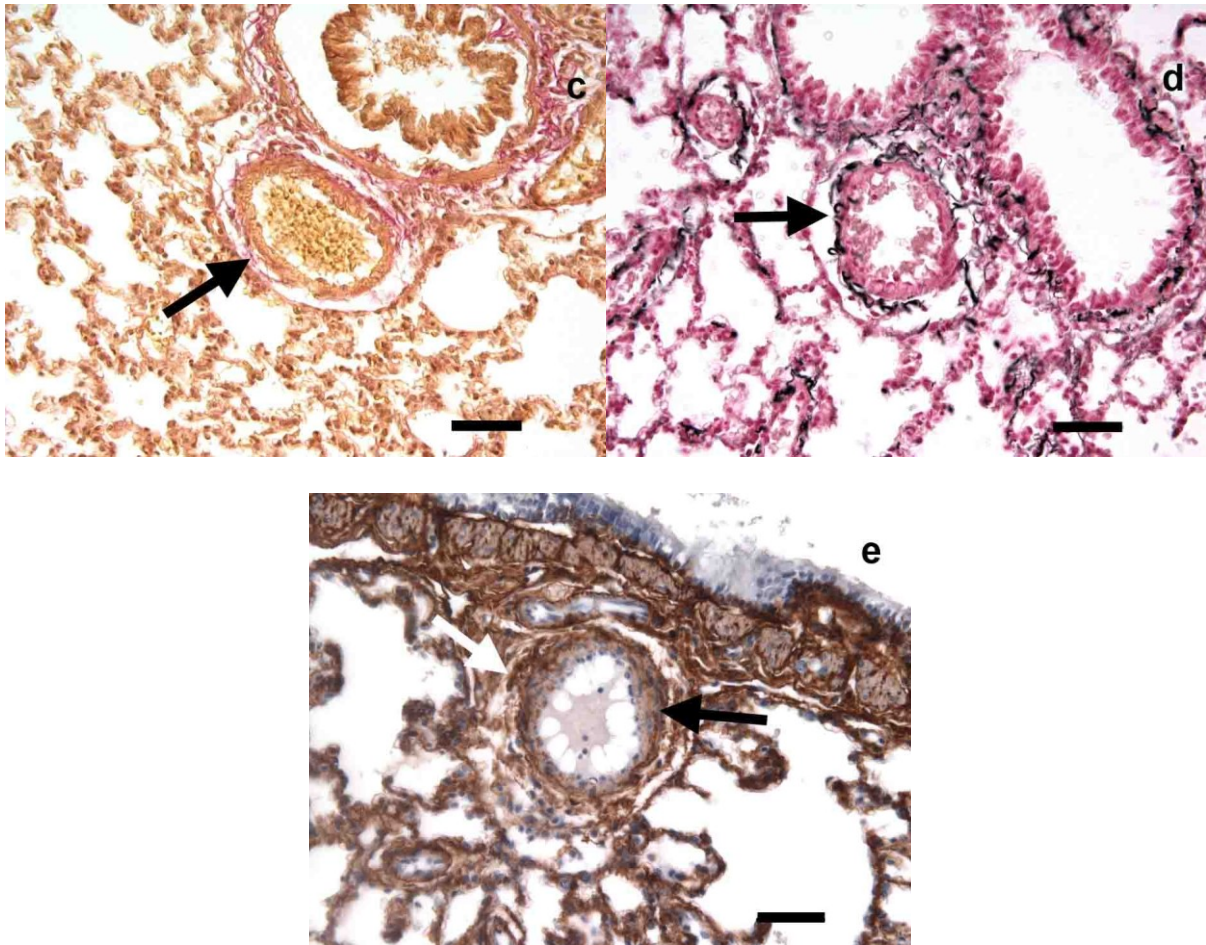




Obr. 12: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny N4K. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Nález u skupiny H4K je obdobný jako u skupiny N4K. Tunica media obsahuje 4-5 vrstev hladkých svalových buněk bez známek hypertrofie (Obr. 13a). Artérie dominantně odpovídají obrazu DLV (Obr. 13b). Tunica adventitia obsahuje jemná vlákna kolagenu I (Obr 13c, černá šipka) a vlákna retikulární, která jeví známky fragmentace (Obr 13d, černá šipka), dále pak mezi vlákny longitudinálně uložené fibroblasty. Nacházíme slabou pozitivitu kolagenu VI v endomysiu a subendoteliálně (Obr. 13e, černá šipka) a dále výrazně pozitivitu v tunica adventitia (Obr. 13e, bílá šipka). Endomysium je pozitivní více než u skupiny H4 a méně než u skupiny N4.



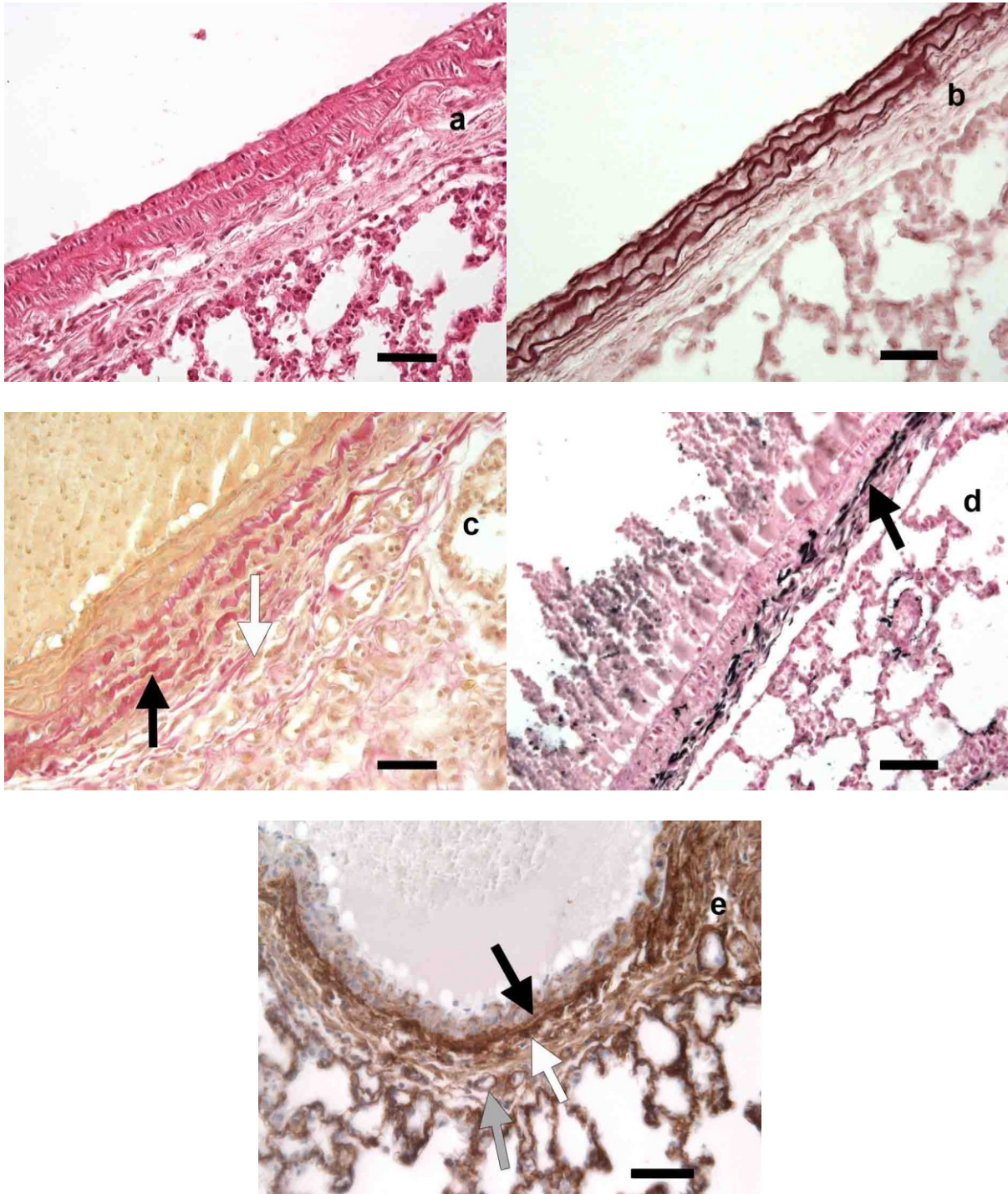


Obr. 13: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny H4K. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

5.1.3. Morfologie velkých vodivých artérií

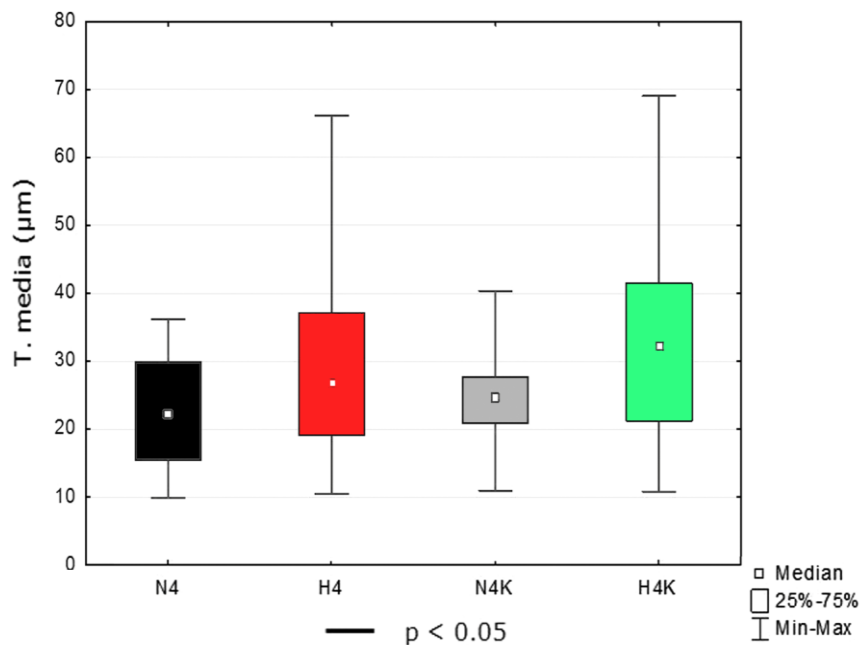
U skupiny N4 nacházíme fyziologické uspořádání velkých artérií s tunica media a tunica adventitia (Obr. 14a), průměrně 4-5 fenestrovaných elastických membrán tunica media (Obr. 14b). Vlákna kolagenu I vytváří v tunica adventitia hustou vnitřní vrstvu tlustých kolagenních vláken (Obr. 14c, černá šipka) a dále zevní vrstvu tenkých a řídce uspořádaných kolagenních vláken (Obr. 14c, bílá šipka). Retikulární vlákna tvoří kontinuální vrstvu na rozhraní tunica media a tunica adventitia (Obr. 14d, černá šipka). Pozitivitu kolagenu VI jsme zaznamenali v endomysiu se zvýrazněním v blízkosti membrana elastica externa (Obr. 14e, černá šipka). Výraznější pozitivita

byla nalezena také ve vnitřní vrstvě tunica adventitia (Obr. 14e, bílá šipka) a dále v bazální membráně endotelií vasa vasorum (Obr. 14e, šedá šipka).

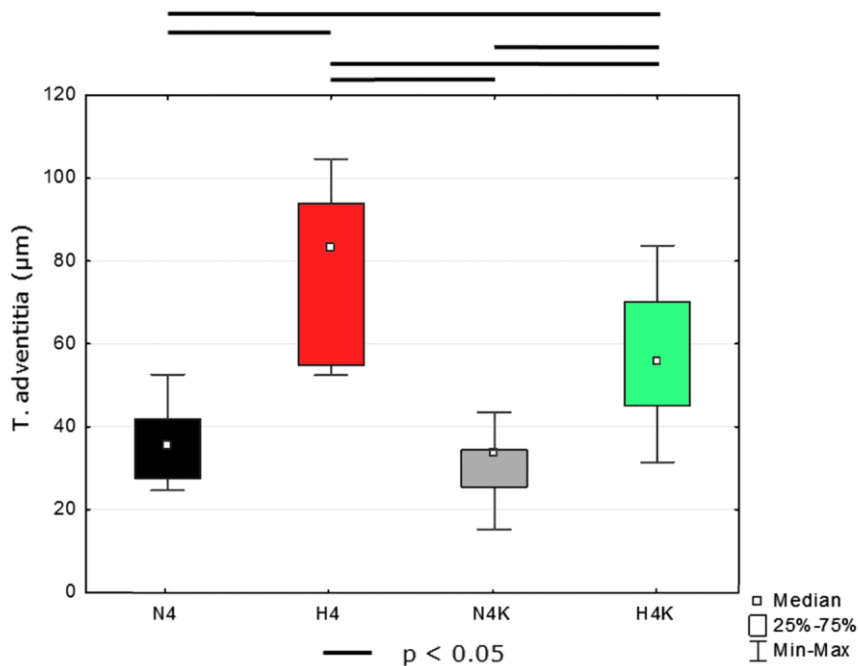


Obr. 14: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny N4. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

U skupiny H4 zůstává tunica media v barvení hematoxylinem-eosinem fyziologické konfigurace (Obr. 15a) a tloušťky jako u skupiny N4 (Graf 1). Zaznamenali jsme nárůst v průměrné tloušťce tunica adventitia u centrálních vodivých artérií s průměrem vyšším než 300 μm oproti kontrolním skupinám (Graf 2).

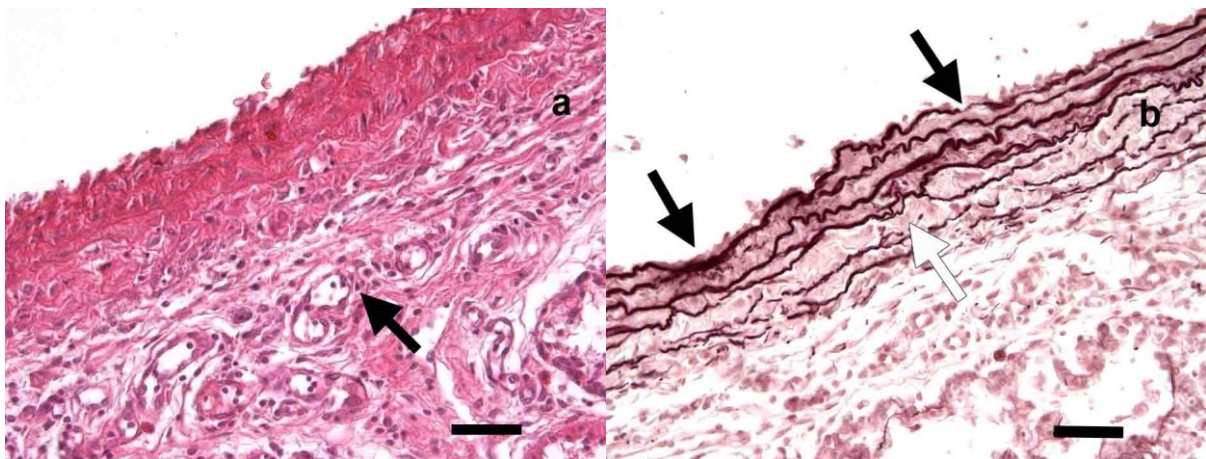


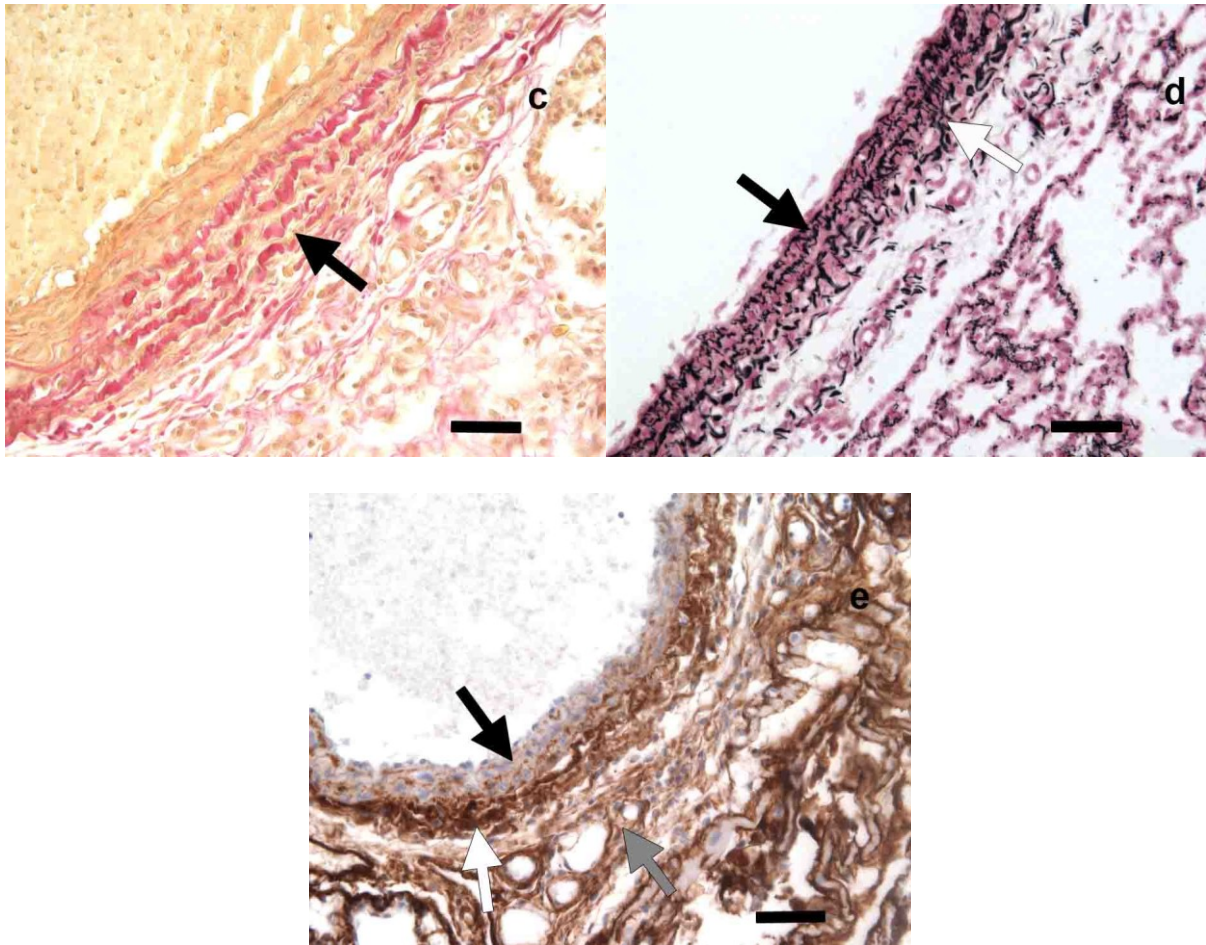
Graf 1: Průměrná tloušťka tunica media velkých vodivých artérií s průměrem >300 μm v průběhu 4denní hypoxie.



Graf 2: Průměrná tloušťka tunica adventitia velkých vodivých artérií s průměrem >300 μm v průběhu 4denní hypoxie.

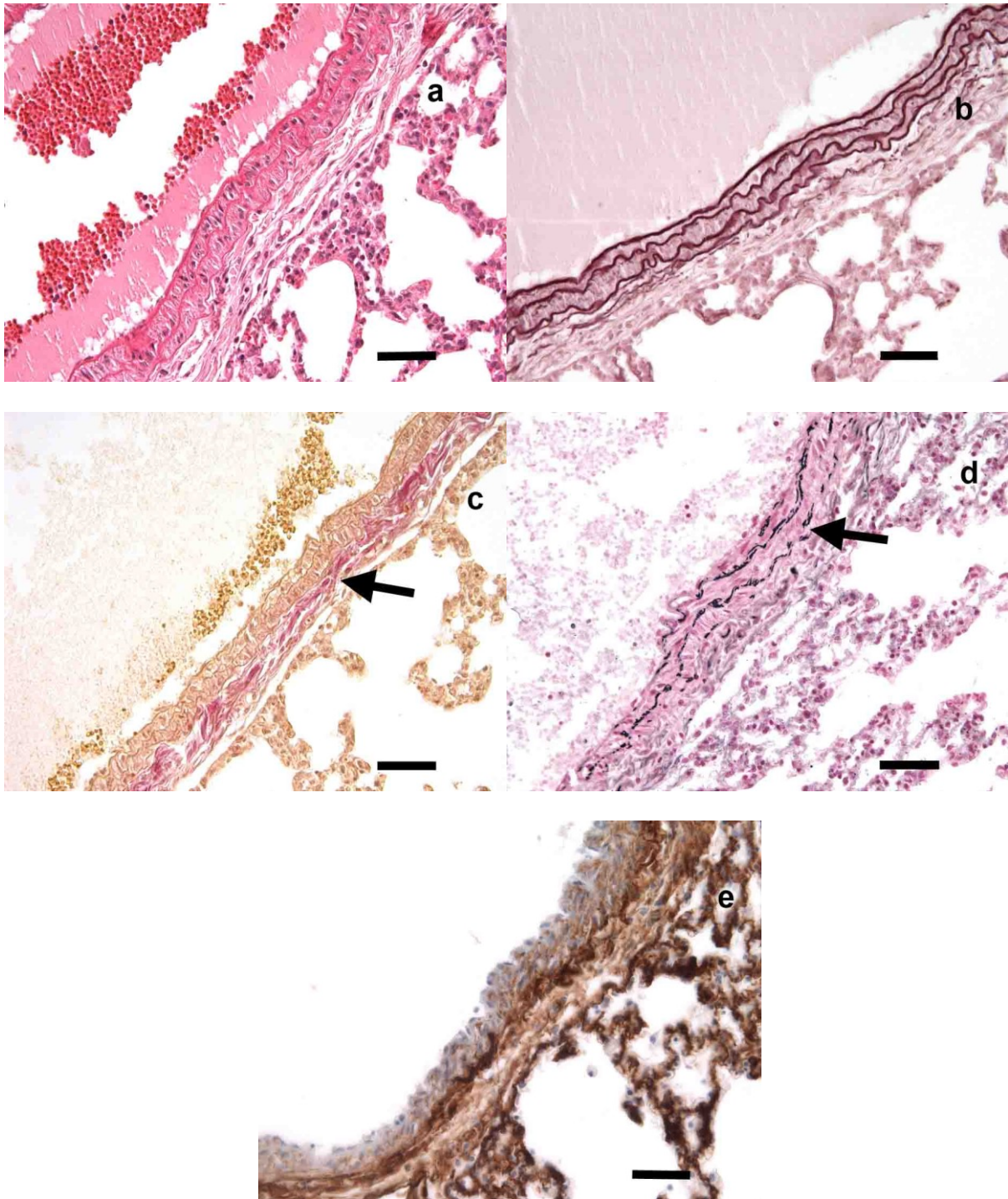
Tunica adventitia je u této skupiny často nepravidelně rozšířena s patrným “sprout-like” množením vasa vasorum (Obr. 15a, černá šipka). Membrana elastica interna je často nepravidelná a přerušovaná (Obr. 15b, černé šipky), stejně jako membranae fenestratae, u kterých je navíc patrné větvení (Obr. 15b, bílá šipka). Vlákna kolagenu I jsou tlustší a množena v tunica adventitia (Obr. 15c, černá šipka). Retikulární vlákna tvoří hustou obálku hladkých svalových buněk tunica media (Obr. 15d, černá šipka), dále pak síť v tunica adventitia (Obr. 15d, bílá šipka). Je patrný pokles pozitivita kolagenu VI v endomysiu (Obr. 15e, černá šipka) oproti N4. Naopak výrazně nárůst v celém rozsahu tunica adventitia (Obr. 15e, bílá šipka). Pozitivita kolagenu VI je výrazněji také v okolí vasa vasorum (Obr. 15e, šedá šipka).





Obr. 15: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny H4. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

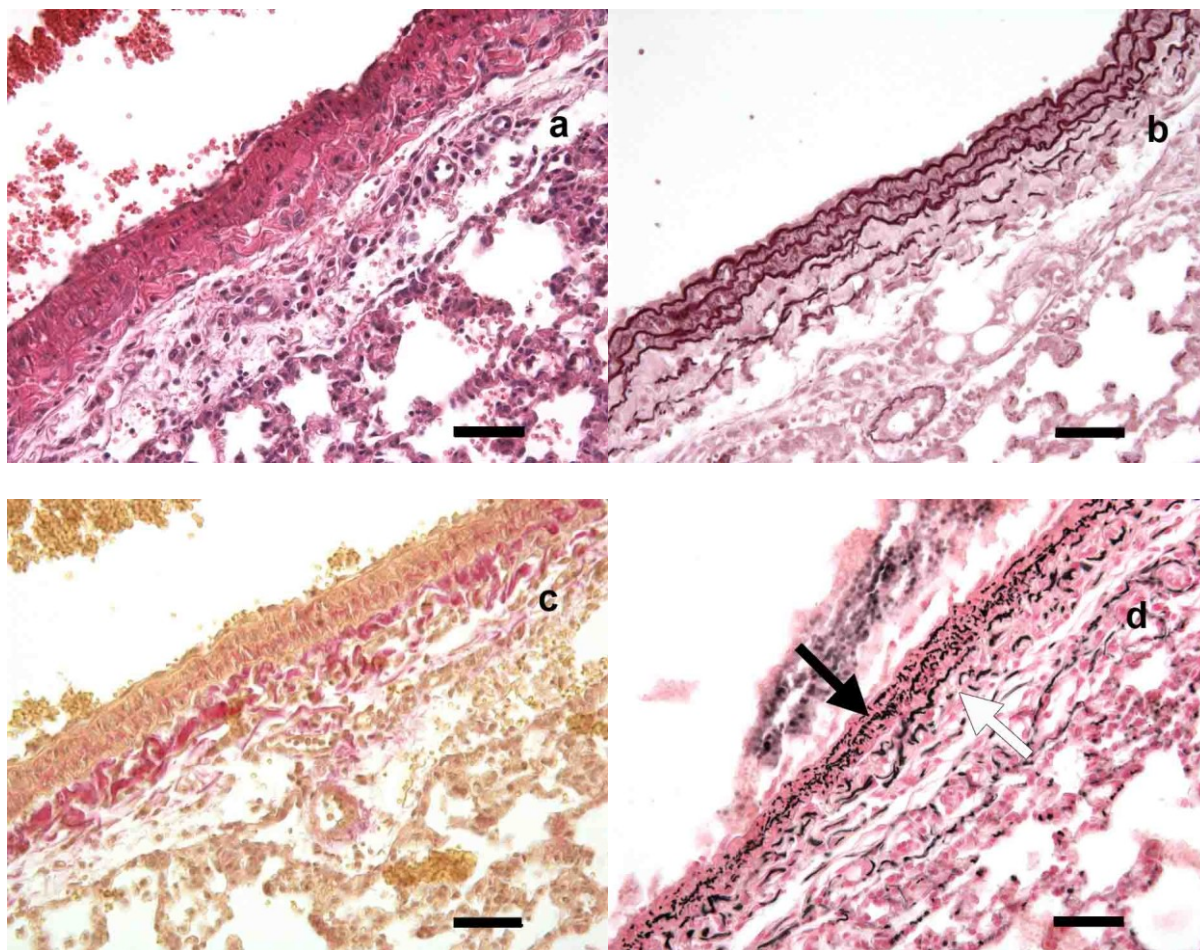
U skupiny N4K zůstávají základní morfologie a uspořádání elastických membrán v nezměněné podobě (Obr. 16a,b). Tloušťka tunica media a tunica adventitia je shodná jako u skupiny N4 (Graf 1,2). Tlustá vlákna kolagenu I z vnitřní vrstvy tunica adventitia se proplétají s tenkými vlákny vrstvy vnější (Obr. 16c, černá šipka). Vrstva retikulárních vláken na rozmezí tunica media a tunica adventitia, pozorovaná u skupiny N4, jeví u skupiny N4K patrnou fragmentaci (Obr. 16d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezům u skupiny N4 (Obr. 16e).

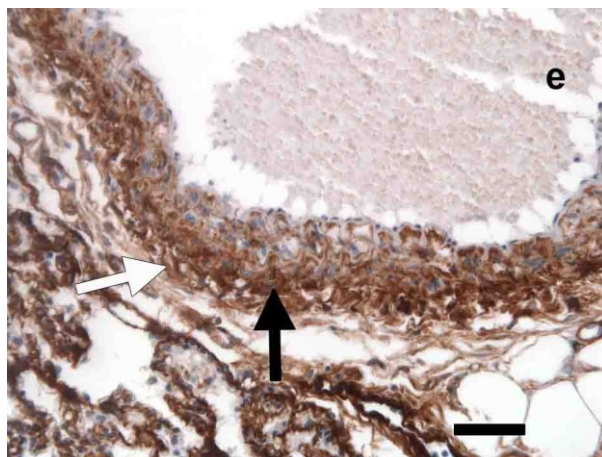


Obr. 16: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny N4K. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

U skupiny H4K je základní morfologie a uspořádání elastických membrán nezměněna (Obr 17a,b). Nezaznamenali jsme změnu v tloušťce tunica media oproti ostatním skupinám (Graf 1), tunica adventitia je tlustší než skupiny N4 a N4K, ale

tenčí než u skupiny H4 (Graf 2). Nález vláken kolagenu I odpovídá nálezu u skupiny H4 (Obr. 17c). Retikulární vlákna nacházíme v tunica media kolem hladkých svalových buněk (Obr. 17d, černá šipka), v tunica adventitia jsou izolovaná retikulární vlákna fragmentovaná (Obr. 17d, bílá šipka). Pozitivitu kolagenu VI nacházíme v endomysiu podobně jako u skupiny N4. Výrazněji je zde pozitivita v rozsahu tunica adventitia (Obr. 17e, černá šipka), dále pak v okolí vasa vasorum (Obr. 17e, bílá šipka).

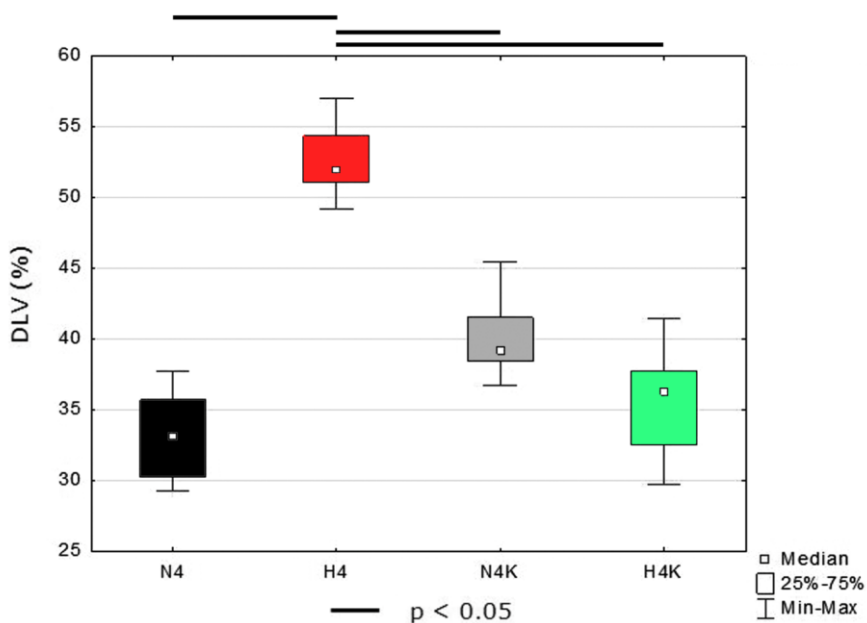




Obr. 17: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny H4K. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

5.1.4. Změny v procentuálním zastoupení “Double laminated vessels“

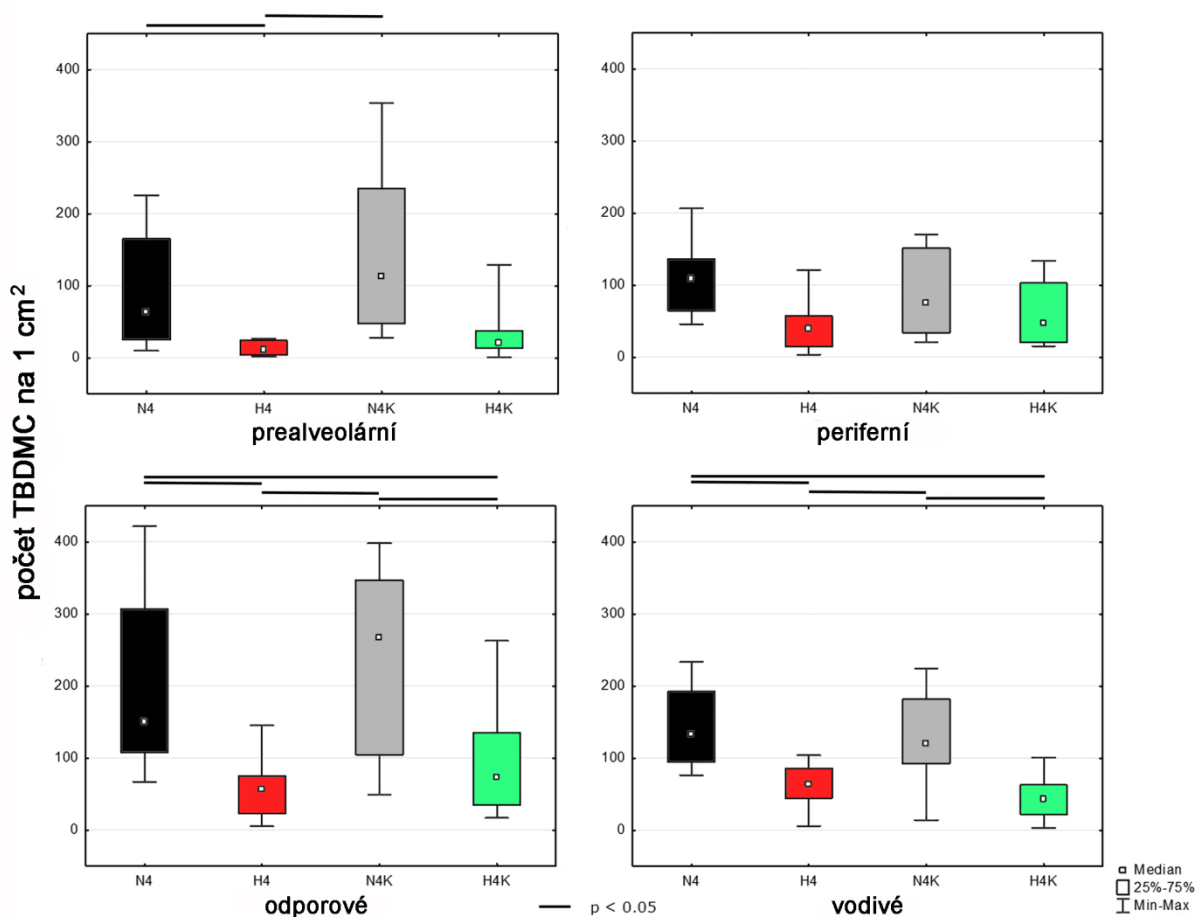
4denní hypoxie u skupiny H4 vedla k signifikantnímu nárůstu v procentuálním zastoupení DLV oproti kontrolním normoxickým skupinám N4 a N4K, ale také oproti skupině H4K. Rozdíl mezi skupinami N4, N4K a H4K zaznamenán nebyl (Graf 3).



Graf 3: Změny v procentuálním zastoupení DLV v průběhu 4denní hypoxie.

5.1.5. Změny v distribuci toluidinovou moří detekovatelných žírných buněk

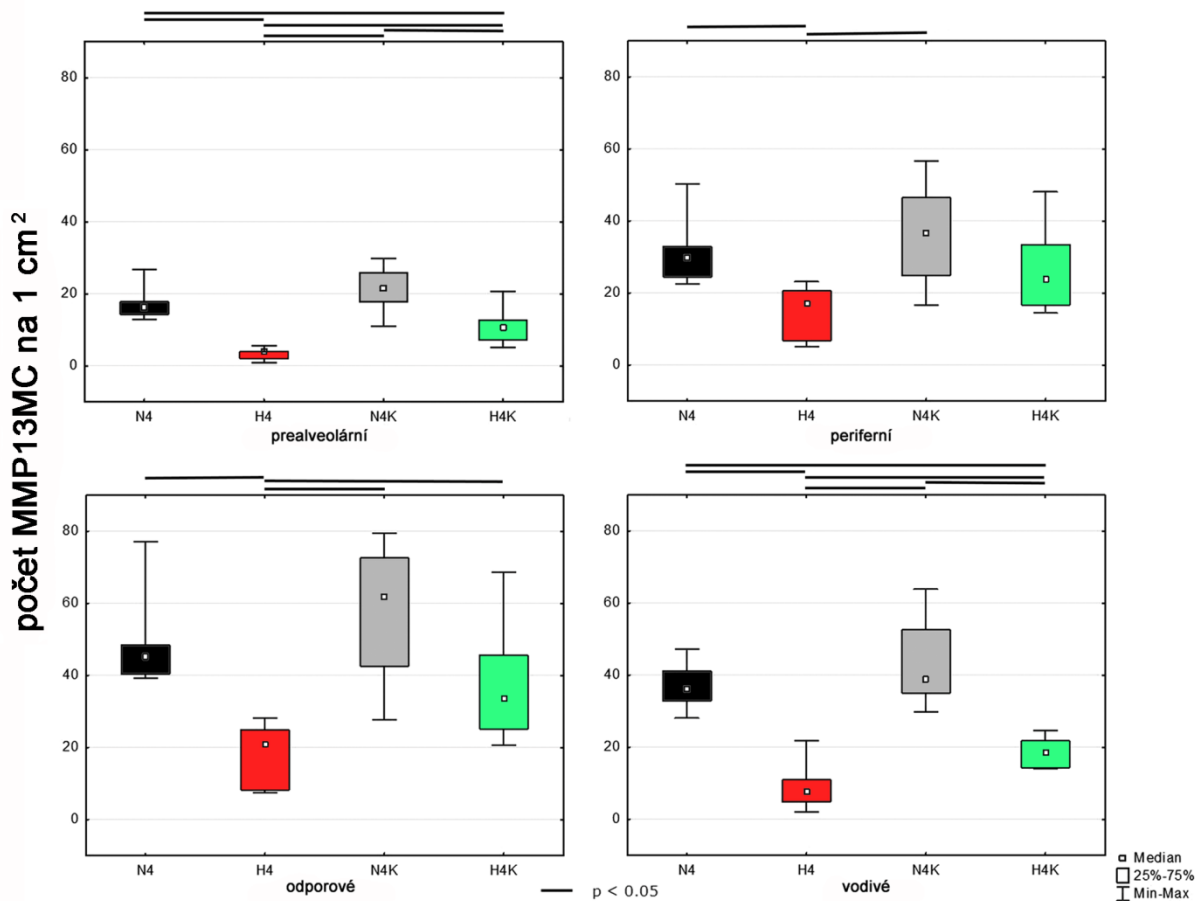
V průběhu 4denního pokusu jsme zaznamenali pokles TBDMC v tunica adventitia periferních odporových artérií (Graf 4c) a velkých vodivých artérií skupin H4 a H4K, oproti skupinám N4 a N4K (Graf 4d). Na úrovni prealveolárních artérií byl zaznamenán pokles v počtu TBDMC u skupiny H4 oproti skupinám N4 a N4K (Graf 4a). Na úrovni periferních osvalených artérií signifikantní rozdíl zaznamenán nebyl (Graf 4b).



Graf 4: Změny v distribuci TBDMC jednotlivých kategorií plicních artérií v průběhu 4denní hypoxie. a) Prealveolární artérie, b) Periferní osvalené artérie, c) Periferní odporové artérie, d) Velké vodivé artérie.

5.1.6. Změny v distribuci matrix metaloproteináza 13 pozitivních žírných buněk

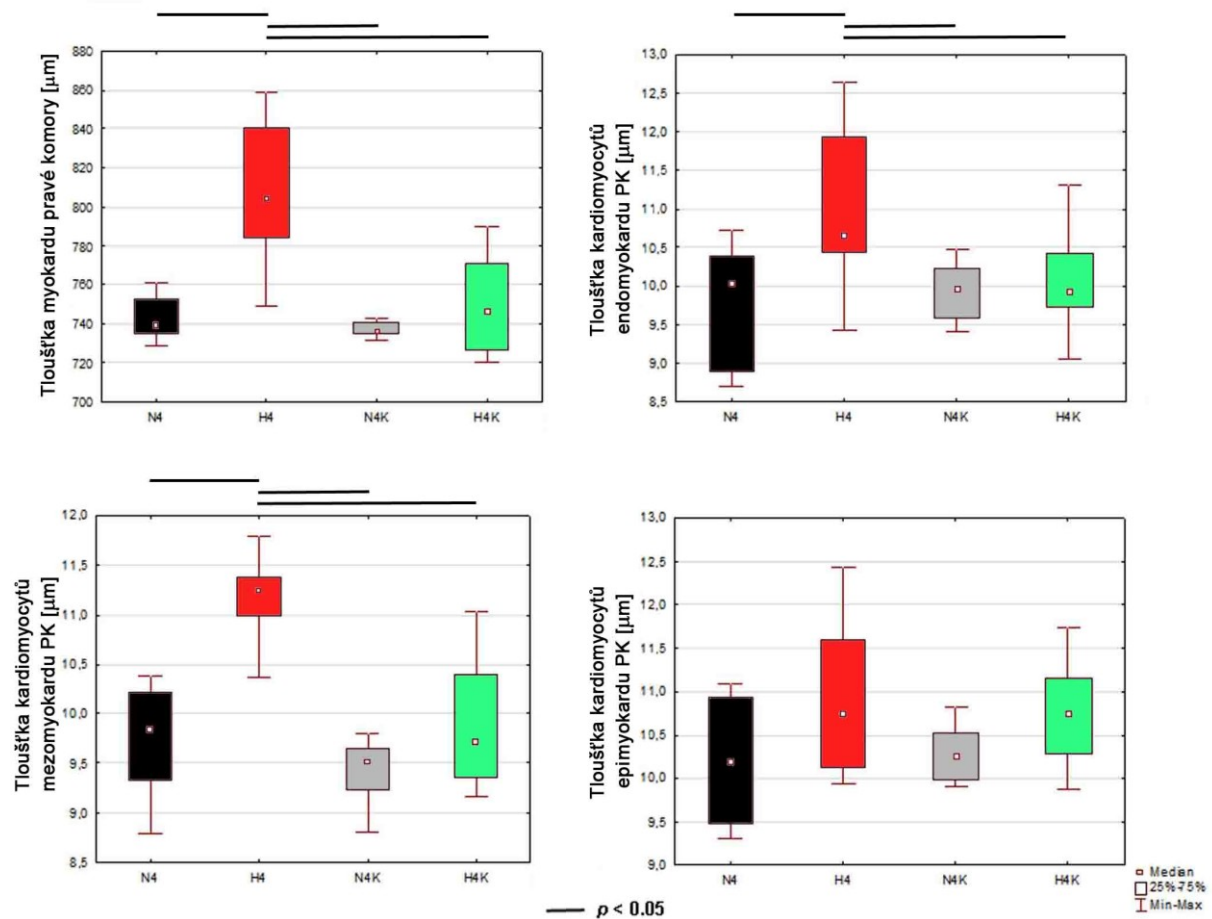
U prealveolárních a centrálních vodivých artérií jsme zaznamenali pokles počtu MMP13MC u skupiny H4 a H4K oproti skupinám N4, N4K. Dále pak pokles MMP13MC skupiny H4 oproti skupině H4K (Graf 5a,d). U periferních osvalených artérií pak pokles MMP13MC skupiny H4 oproti skupinám N4 a N4K (Graf 5b). Na úrovni periferních odporových artérií jsme zaznamenali pokles MMP13MC skupiny H4 oproti skupinám N4, N4K a H4K (Graf 5c).



Graf 5: Změny v distribuci MMP13MC jednotlivých kategorií plicních artérií v průběhu 4denní hypoxie. a) Prealveolární artérie, b) Periferní osvalené artérie, c) Periferní odporové artérie, d) Velké vodivé artérie.

5.1.7. Morfometrické změny pravé komory srdeční

4denní hypoxie u skupiny H4 vedla k hypertrofii myokardu pravé komory srdeční se signifikantním nárůstem tloušťky myokardu oproti skupinám N4, N4K a H4K (Graf 6a). Dále jsme zaznamenali hypertrofii s nárůstem tloušťky kardiomyocytů pravé komory srdeční ve vrstvě endomyokardu (Graf 6b) a mesomyokardu (Graf 6c). Signifikantní změny jsme nezaznamenali pouze u kardiomyocytů epimyokardu (Graf 6d).

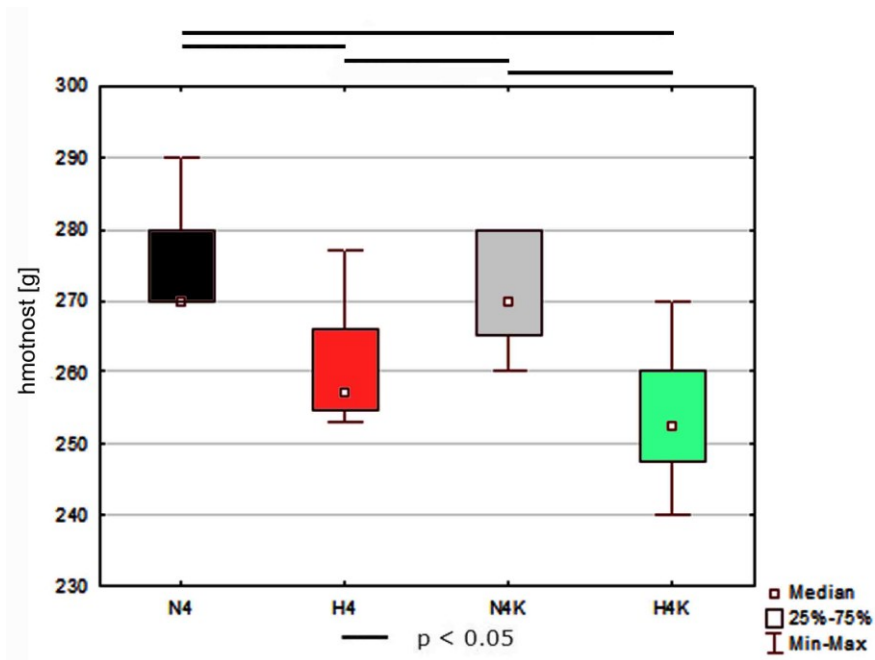


Graf 6: Změny v tloušťce myokardu [μm] pravé komory a v tloušťce kardiomyocytů [μm] jednotlivých vrstev myokardu v průběhu 4denní hypoxie.

- Tloušťka myokardu pravé komory
- Tloušťka kardiomyocytů endomyokardu pravé komory
- Tloušťka kardiomyocytů mesomyokardu pravé komory
- Tloušťka kardiomyocytů epimyokardu pravé komory

5.1.8. Změny ve výsledné hmotnosti potkanů

Všichni potkani pokusu 4denní hypoxie zahajovali experiment s průměrnou hmotností $238 \pm 1\text{g}$. Skupiny vystavené hypoxii dosáhly signifikantně nižší průměrné hmotnosti s hodnotou $257 \pm 1\text{g}$, než skupiny normoxické, u kterých byla průměrná hmotnost $273 \pm 2\text{g}$ (Graf 7).

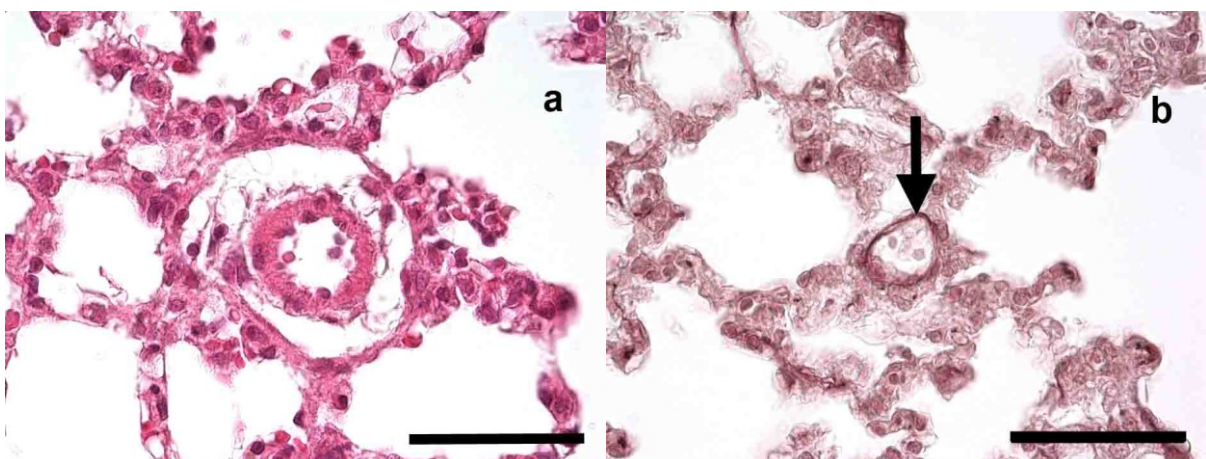


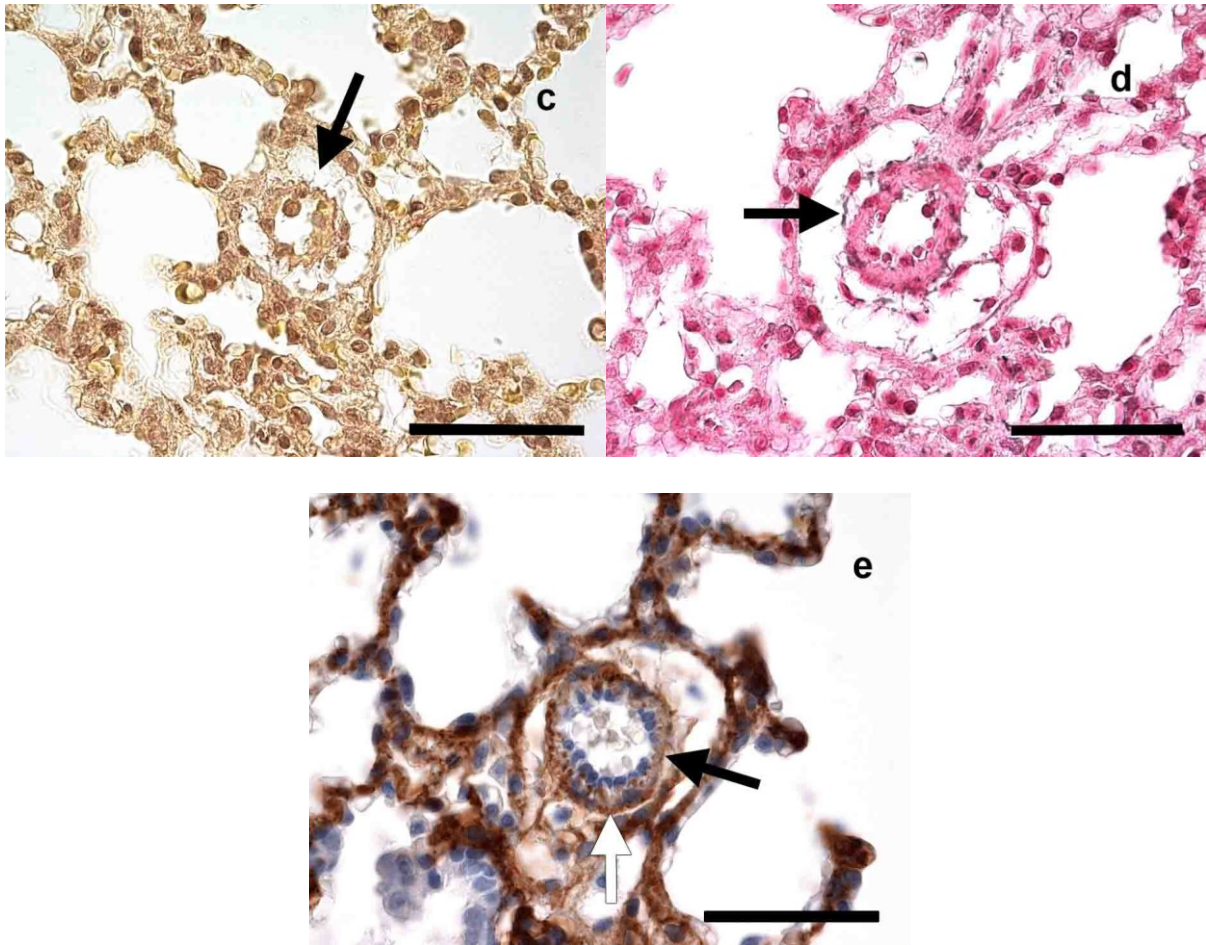
Graf 7: Průměrná hmotnost potkanů 4denního experimentu na konci pokusu.

5.2. Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie

5.2.1. Morfologie prealveolárních artérií

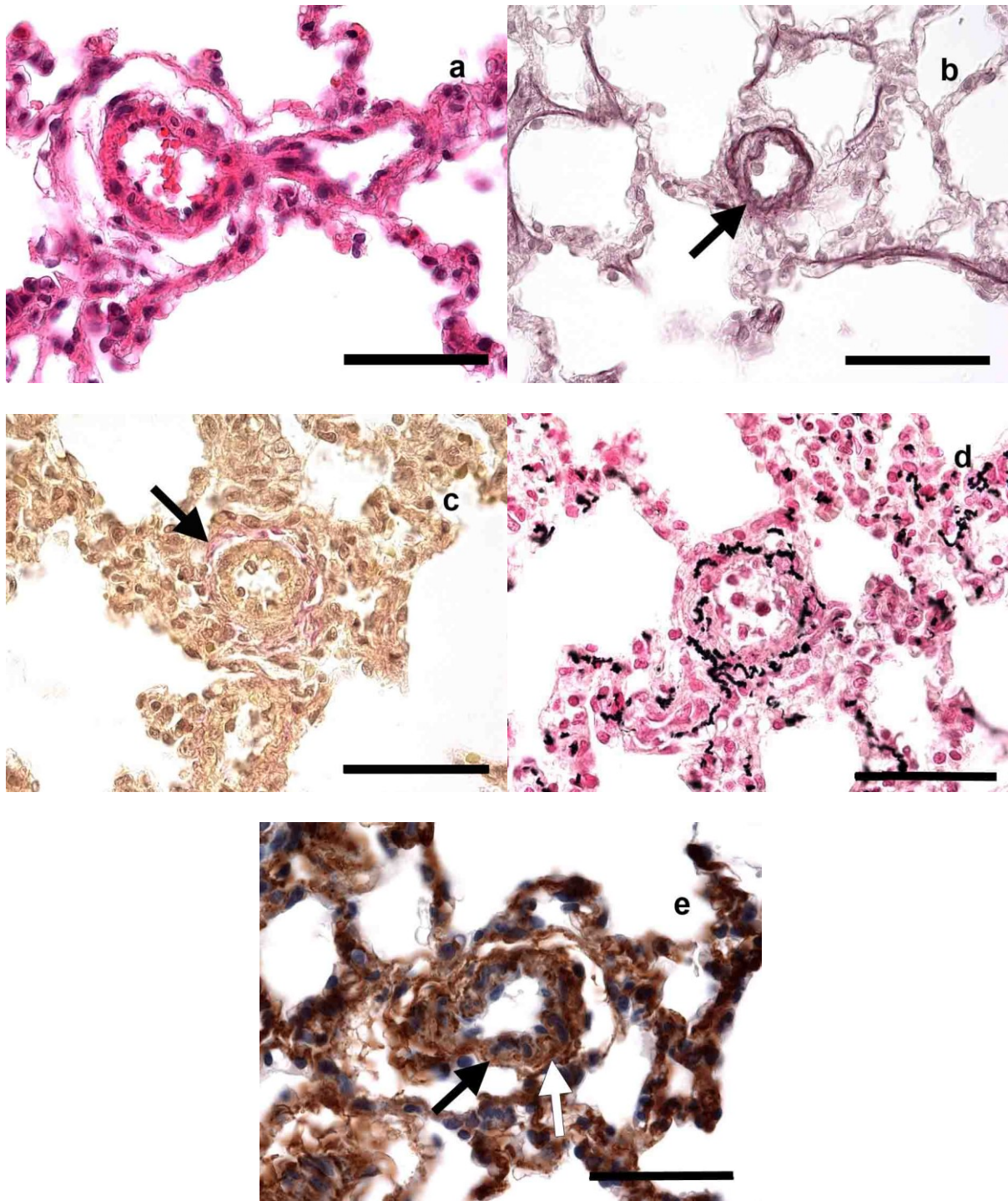
Morfologický nález skupiny prealveolárních artérií skupiny N21 zcela odpovídá nálezu skupiny N4 u studie 1. Prealveolární artérie obsahují nejvýše 1-2 vrstvy hladkých svalových buněk s tím, že osvalení stěny artérií je symetrické (Obr. 18a). Artérie utvářejí pouze membrana elastica interna (Obr. 18b, černá šipka). V tunica adventitia prealveolárních artérií jsou ojedinělé fibroblasty, tenká vlákna kolagenu I (Obr. 18c, černá šipka) a vlákna retikulární (Obr. 18d, černá šipka). Cytoplasma fibroblastů je eosinofilní a obsahuje jádro s převahou heterochromatinu. Pozitivitu kolagenu VI jsme zaznamenali v bazální membráně pod endoteliemi (Obr. 18e, černá šipka), tato vrstva je nesouvislá, endomysium je rovněž pozitivní (Obr. 18e, bílá šipka).





Obr. 18: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny N21. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

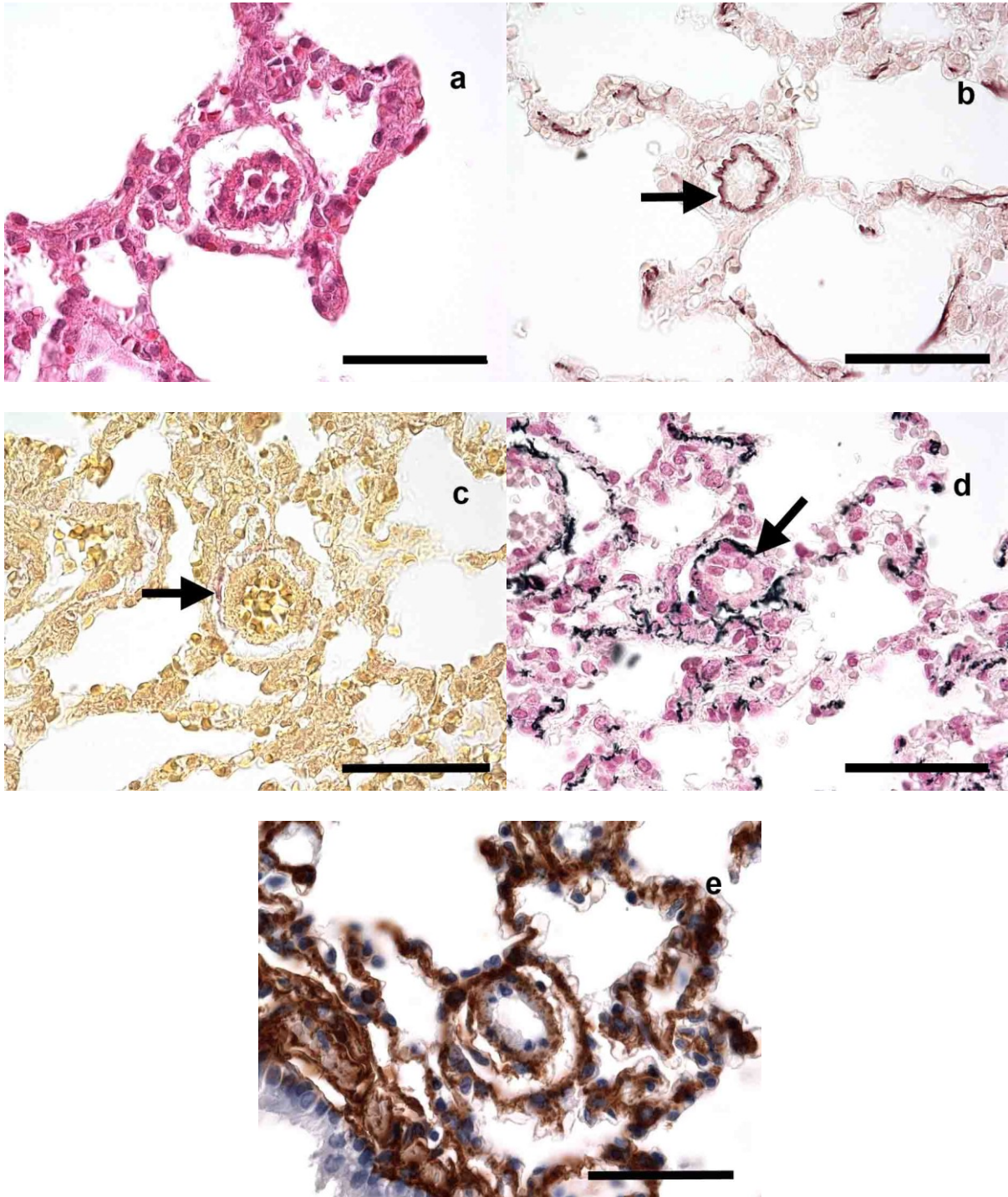
Prealveolární artérie skupiny H21 jsou muskularizované více než 3 vrstvami hladkých svalových buněk (Obr. 19a). Nalézáme četné artérie s formovanou membrana elastica externa přes více než $\frac{1}{2}$ obvodu do obrazu DLV (Obr. 19b, černá šipka). Pozorujeme zmnožení vláken kolagenu I v tunica adventitia bez patrné stratifikace (Obr. 19c, černá šipka) a dále zmnožení vláken retikulárních v endomysiu a v tunica adventitia bez patrné fragmentace (Obr. 19d). Pozitivita kolagenu VI je výrazněji patrná v endomysiu (Obr. 19e, černá šipka) a dále v tunica adventitia (Obr. 19e, bílá šipka).



Obr. 19: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny H21. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

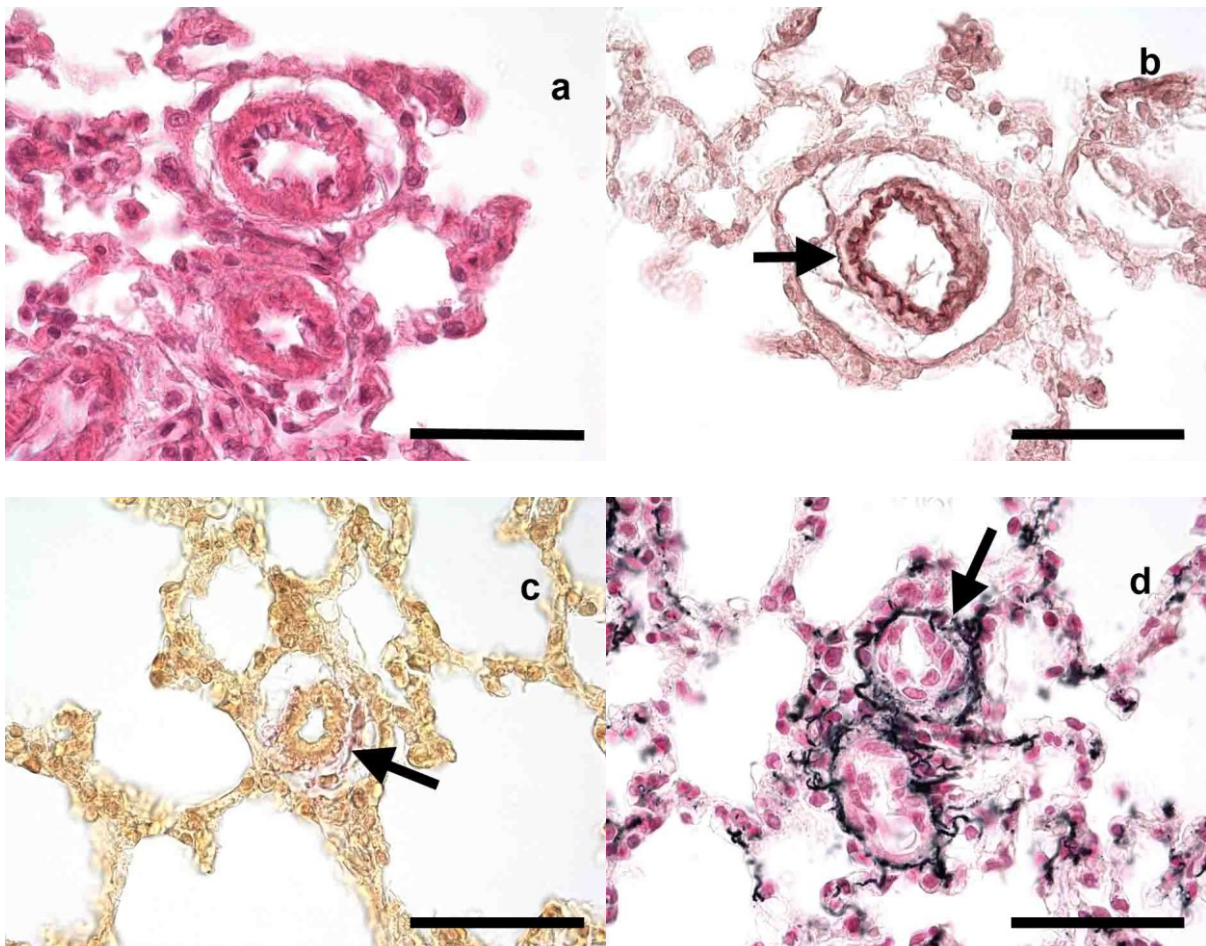
Základní morfologie prealveolárních artérií skupiny N21KZ odpovídá morfologii skupiny N21, tedy osvalení 1-2 vrstvami hladkých svalových buněk (Obr. 20a). Artérie tvoří pouze membrana elastica interna (Obr. 20b, černá šipka), vlákna

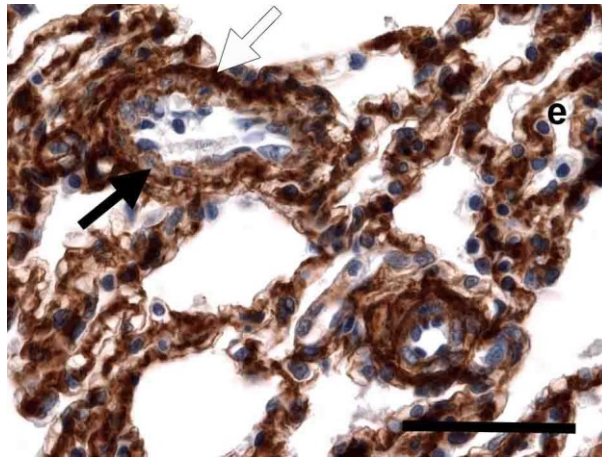
kolagenu I jsou jemná v tunica adventitia (Obr. 20c, černá šipka) a retikulární vlákna jsou v tunica adventitia mírně zmnožená s patrnou fragmentací (Obr. 20d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezu u skupiny N21 (Obr. 20e).



Obr. 20: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny N21KZ. (měřítko = 20 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

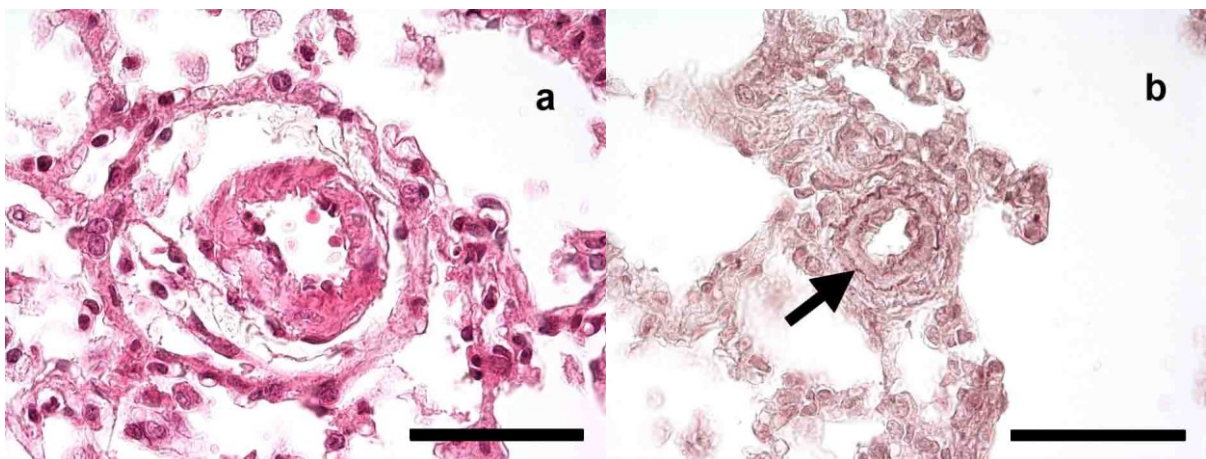
Prealveolární artérie skupiny H21KZ jsou symetricky muskularizované s 3-5 vrstvami hladkých svalových buněk v tunica media (Obr 21a). Utvářejí často membrana elastica externa do obrazu DLV (Obr. 21b, černá šipka), nalézáme ale také početné artérie s pouze membrana elastica interna. Vlákna kolagenu I jsou v rozsahu tunica adventitia zmnožená a tlustá (Obr. 21c, černá šipka). Retikulární vlákna jsou tlustá a fragmentovaná bez patrných známek stratifikace v arteriální stěně (Obr. 21d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI je slabá v endomysiu (Obr. 21e, černá šipka) a výrazněji pak v rozsahu tunica adventitia (Obr. 21e, bílá šipka).

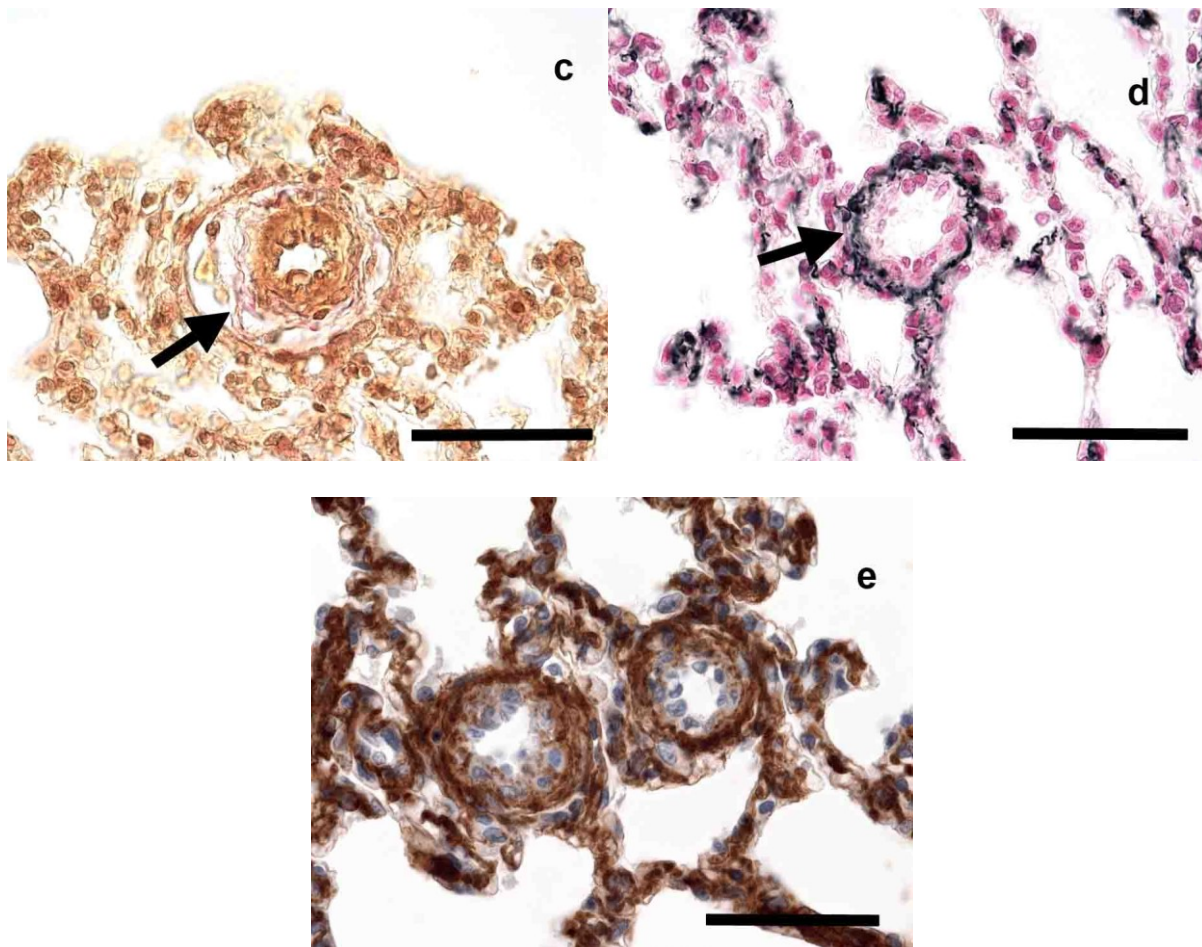




Obr. 21: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny H21KZ. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Základní morfologie prealveolárních artérií skupiny H21KK odpovídá nálezu skupiny H21. Osvalení je patrné ve více než 3 vrstvách hladkých svalových buněk (Obr. 22a). Artérie tvoří dominantně membrana elastica externa do obrazu DLV (Obr. 22b, černá šipka). Vlákna kolagenu I v tunica adventitia jsou zmnožena (Obr. 22c, černá šipka), retikulární vlákna v endomysiu a v tunica adventitia jsou také početnější, avšak s patrnou fragmentací (Obr. 22d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezu skupiny H21 (Obr. 22e).

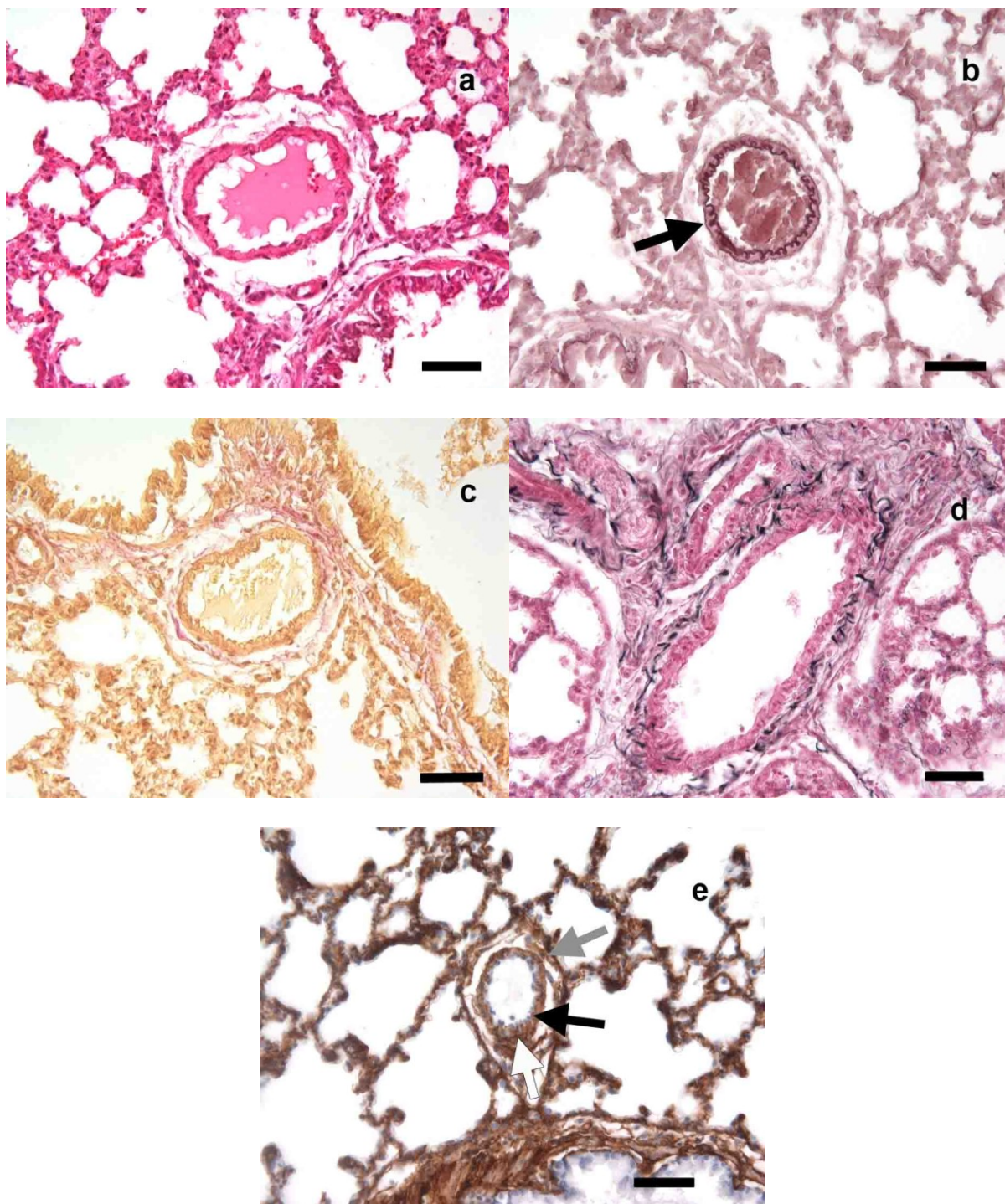




Obr. 22: Morfologie prealveolárních artérií u skupiny H21KK. (měřítko = 20 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

5.2.2. Morfologie osvalených periferních artérií

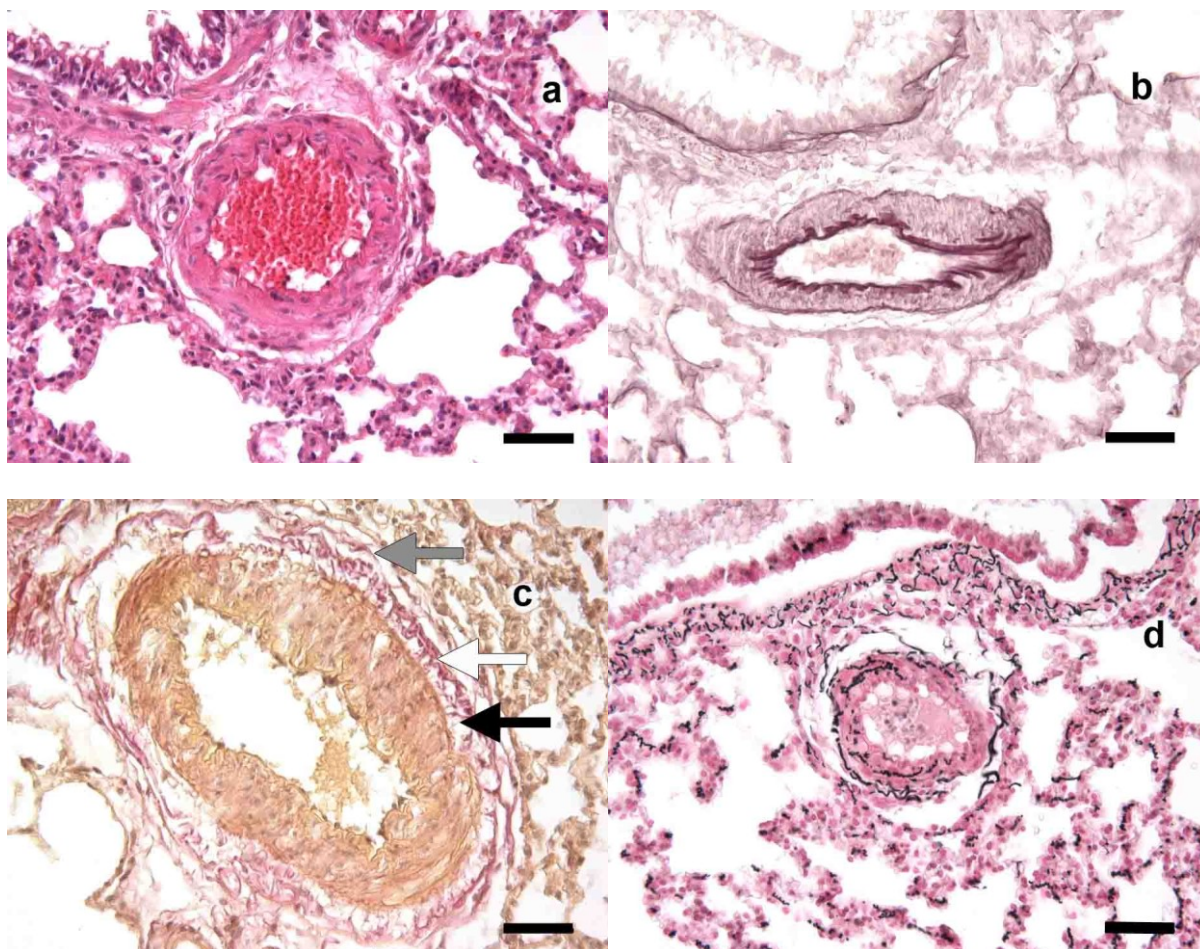
Morfologie osvalených periferních artérií skupiny N21 opět plně odpovídá morfologii skupiny N4 ze studie 1. Artérie jsou symetricky osvalené 4-5 vrstvami hladkých svalových buněk (Obr. 23a). Některé menší artérie utvářejí pouze membrana elastica interna, většinou však odpovídají obrazu DLV (Obr. 23b, černá šipka). Tunica adventitia obsahuje jemná vlákna kolagenu I (Obr. 23c) a vlákna retikulární (Obr. 23d), dále pak mezi vlákny longitudinálně uložené fibroblasty. Kolagen VI je pozitivní v rozsahu bazální membrány endotelí (Obr. 23e, černá šipka), dále pak v endomysiu tunica media (Obr. 23e, bílá šipka) a mírně v tunica adventitia (Obr. 23e, šedá šipka).

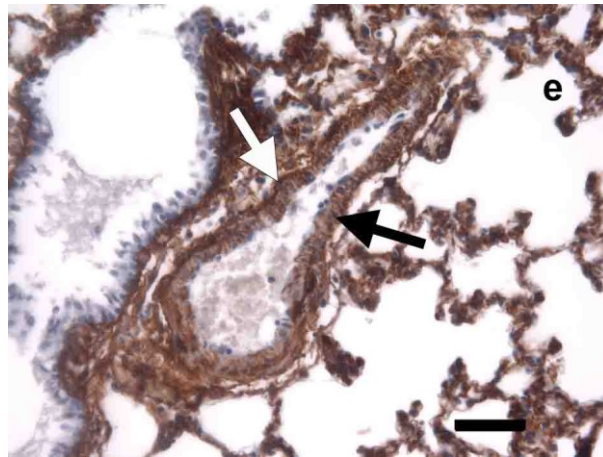


Obr. 23: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny N21. (měřítko = 50 μm).
 a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Osvalené periferní artérie skupiny H21 jeví známky progrese asymetrické hypertrofie tunica media s formováním tzv. šikmých segmentů a obsahující více než 5 vrstev hladkých svalových buněk (Obr. 24a). Naprosto převažující jsou artérie, utvářející

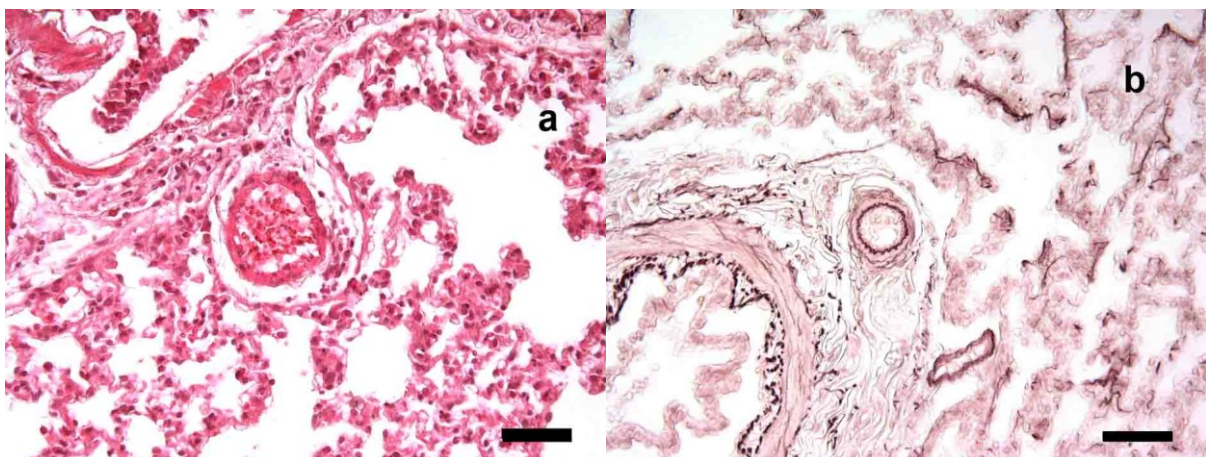
membrana elastica externa, která spolu s již existující membrana elastica interna vytváří obraz DLV (Obr. 24b). Vlákná kolagenu I jsou v tunica adventitia uspořádány do 3 vrstev. Vnitřní vrstvy s tenkými vlákny, které oddělují tunica media a tunica adventitia (Obr. 24c, černá šipka). Centrální vrstva s četnými tlustými kolagenními vlákny (Obr. 24c, bílá šipka) a zevní vrstva s tenčími vlákny (Obr. 24c, šedá šipka). Retikulární vlákna jsou zmnožená v rozsahu endomysia a také v tunica adventitia bez patrné stratifikace (Obr. 24d). Pozitivita kolagenu VI je méně v endomysiu (Obr. 24e, černá šipka), výrazněji pak v tunica adventitia s maximem v blízkosti membrana elastica externa (Obr. 24e, bílá šipka).

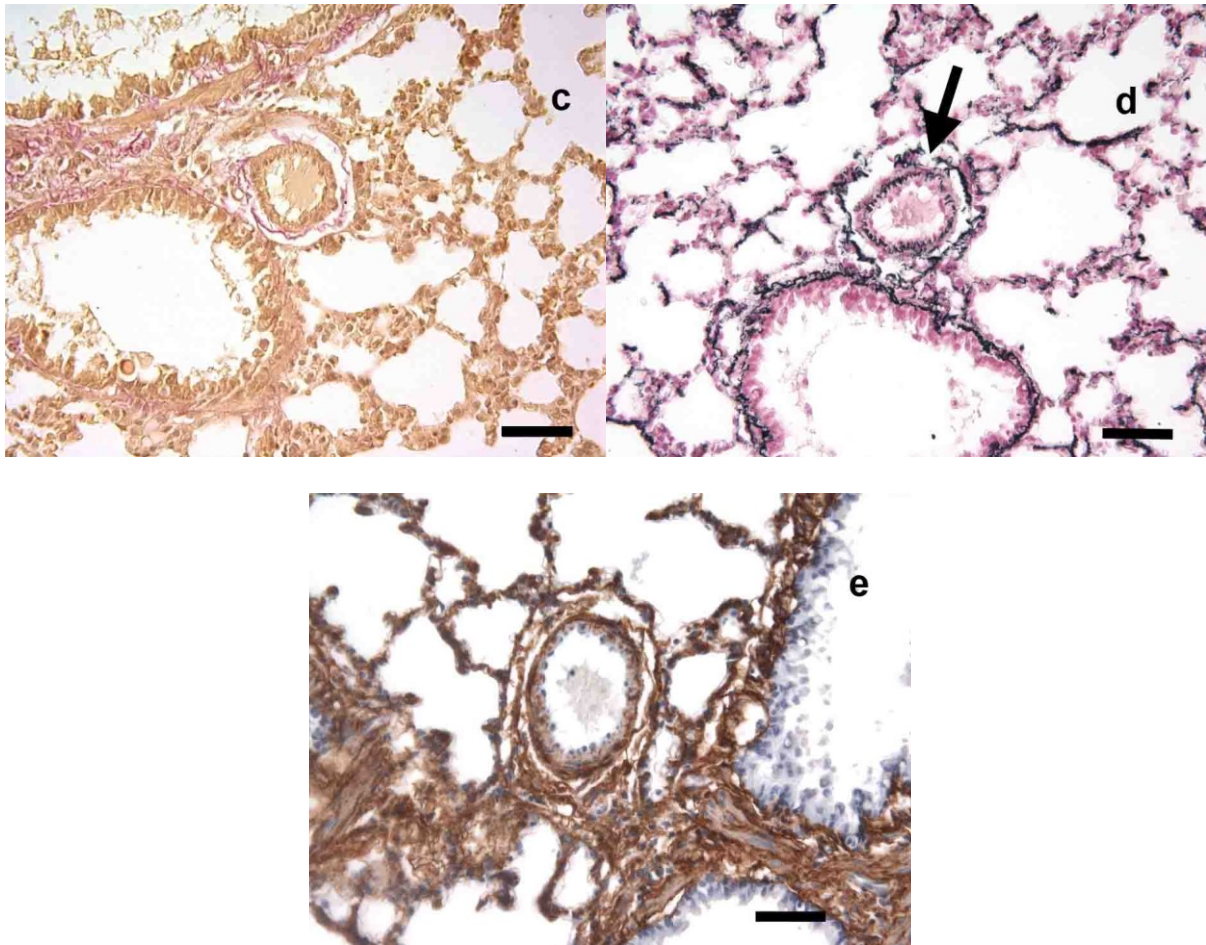




Obr. 24: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny H21. (měřítko = 50 μ m).
 a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Osvalené periferní artérie skupiny N21KZ jsou morfologicky téměř identické se skupinou N21. Změny jsme nezaznamenali v charakteru osvalení tunica media (Obr. 25a), v utváření membrana elastica externa (Obr. 25b) a v kvalitě a kvantitě vláken kolagenu I (Obr. 25c). Pouze retikulární vlákna v rozsahu tunica adventitia se odlišují, patrnou fragmentací (Obr. 25d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezů skupiny N21 (Obr. 25e).

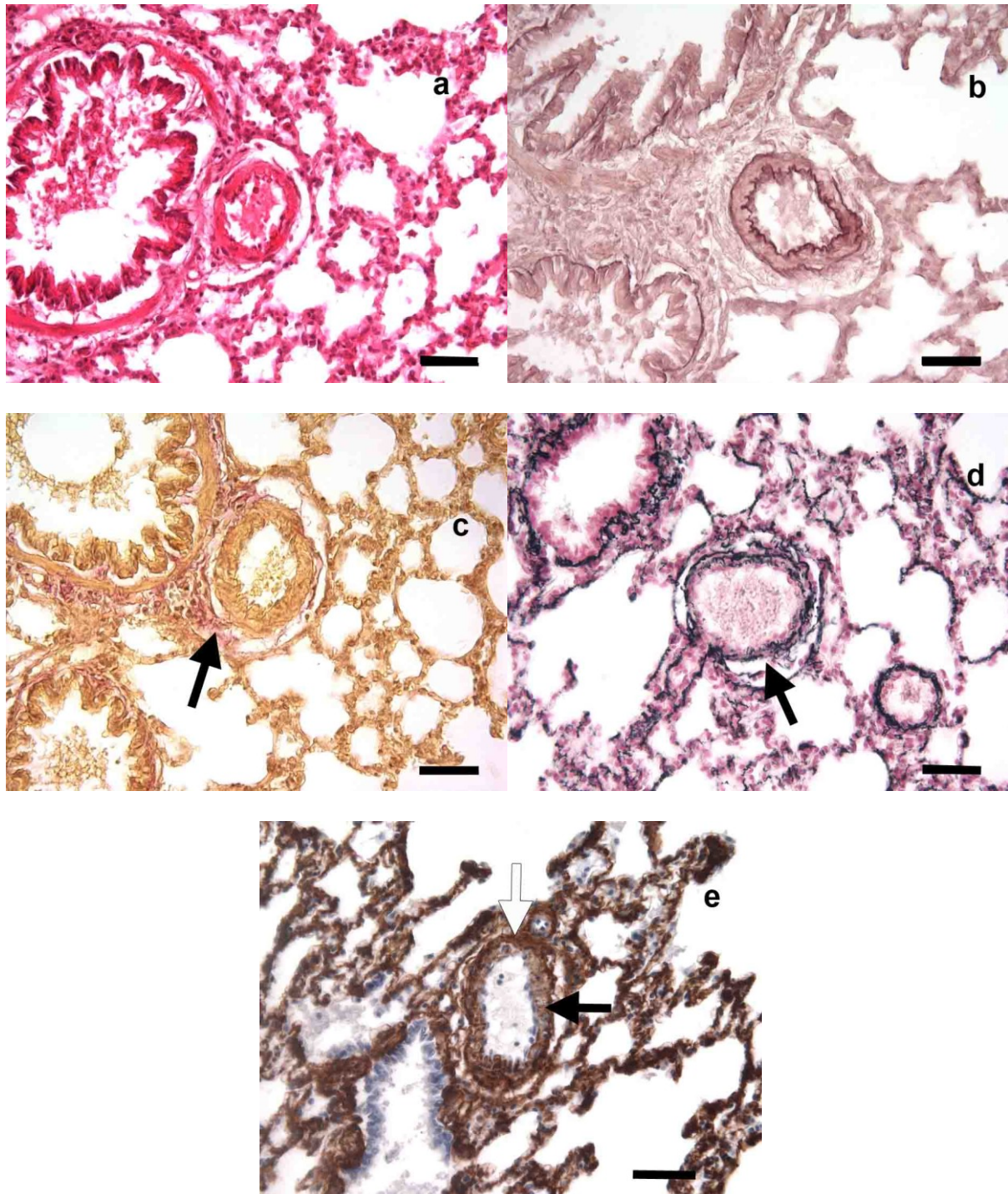




Obr. 25: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny N21KZ. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

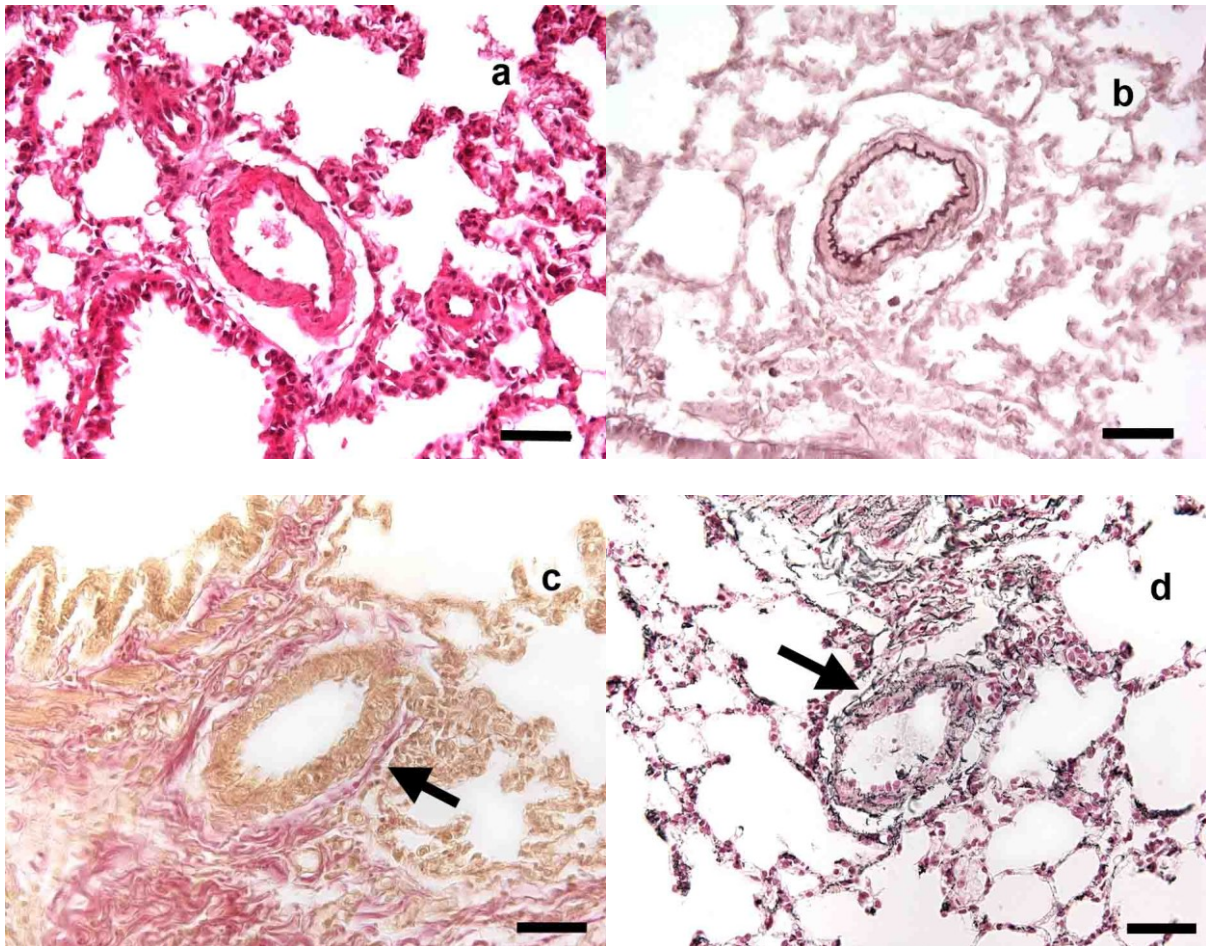
U osvalených periferních artérií skupiny H21KZ jsme zaznamenali známky hypertrofie tunica media, ta je však zcela symetrická bez utváření tzv. šikmých segmentů (Obr. 26a). Artérie většinou formují membrana elastica externa do obrazu DLV (Obr. 26b), nacházíme zde však také ojedinělé artérie s pouze membrana elastica interna jako u skupiny N21. Vlákna kolagenu I jsou v rozsahu tunica adventitia zmnožená a ztluštělá s patrnou stratifikací jako u skupiny H21 (Obr. 26c, černá šipka). Retikulární vlákna jsou zmnožená v rozsahu endomysia a tunica adventitia, bez stratifikace a s patrnými fragmentacemi (Obr. 26d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI je v rozsahu endomysia (Obr. 26e, černá šipka) a tunica

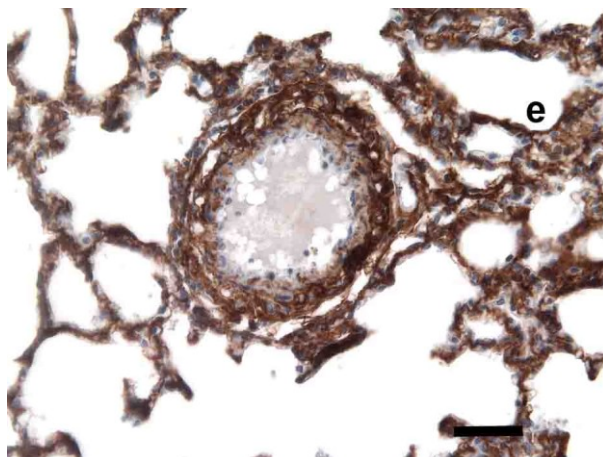
adventitia (Obr. 26b, bílá šipka). Pozitivita v endomysiu je silnější než u skupiny H21, avšak slabší než u skupiny N21.



Obr. 26: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny H21KZ. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Základní morfologie a osvalení tunica media u skupiny H21KK odpovídá skupině H21 (Obr. 27a). Artérie také tvoří membrana elastica externa do obrazu DLV (Obr. 27b) a stejně jako u skupiny H21 obsahují zmnožená a tlustá vlákna kolagenu I v tunica adventitia s patrným trilaminárním uspořádáním (Obr. 27c, černá šipka). Retikulární vlákna v endomysiu a tunica adventitia jsou u této skupiny tenká, méně častá a jeví známky fragmentace (Obr. 27d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezu skupiny H21 (Obr. 27e).

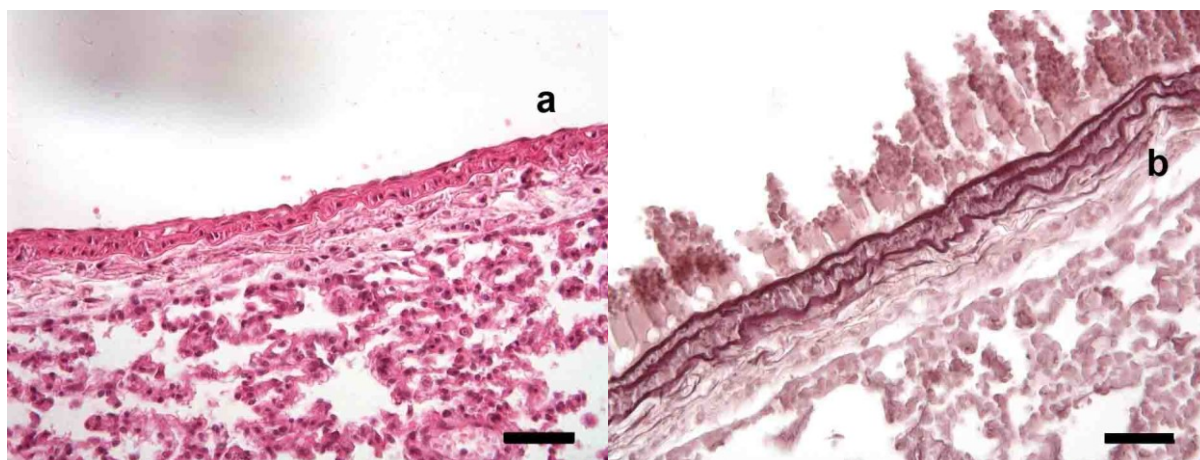


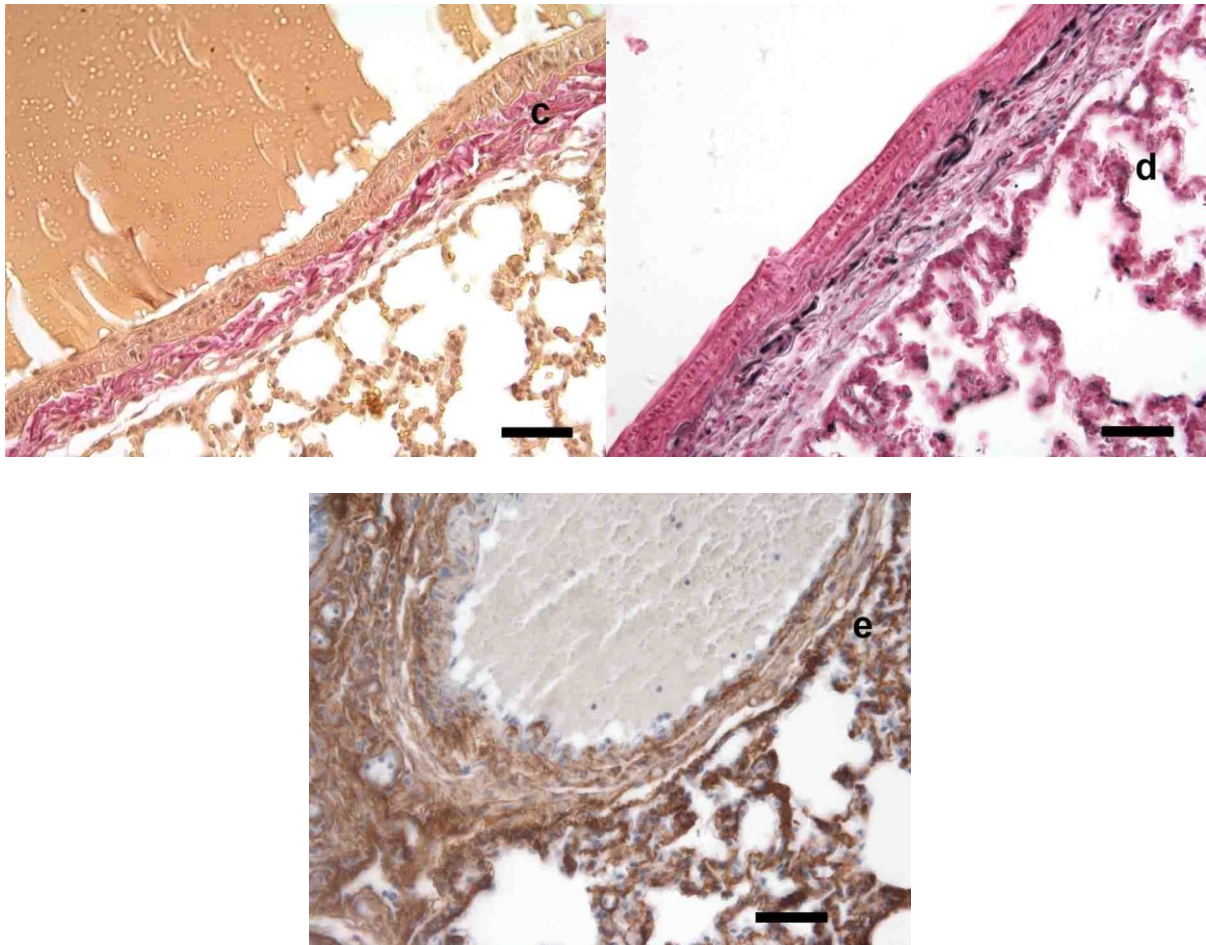


Obr. 27: Morfologie osvalených periferních artérií u skupiny H21KK. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

5.2.3. Morfologie velkých vodivých artérií

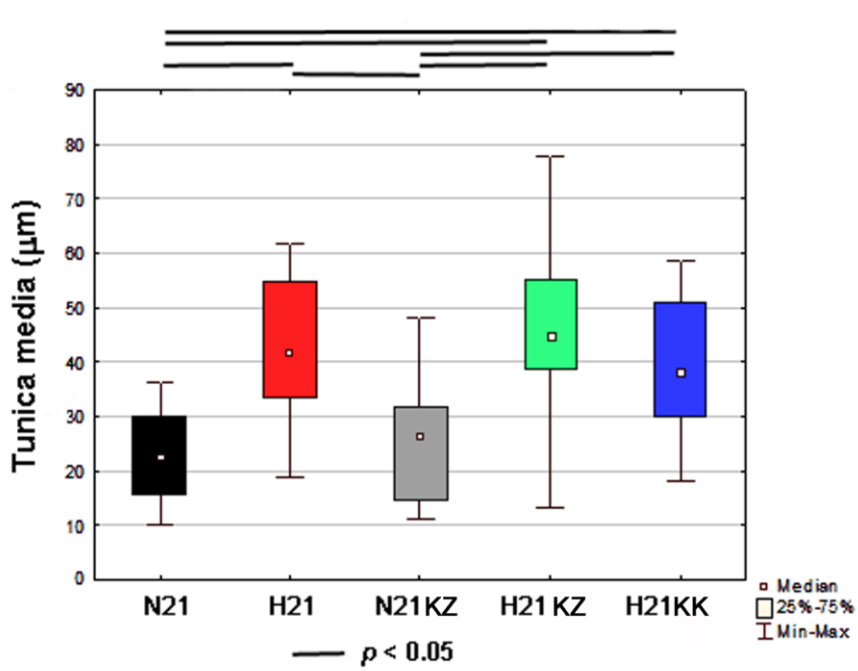
Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny N21 se neliší od skupiny N4 ze studie 1, a to jak v charakteru osvalení tunica media (Obr. 28a), tak v uspořádání fenestrováných elastických membrán tunica media (Obr. 28b), v charakteru vláken kolagenu I (Obr. 28c) a vláken retikulárních (Obr. 29d). Pozitivita kolagenu VI je stejná jako u skupiny N4 (Obr. 28e).



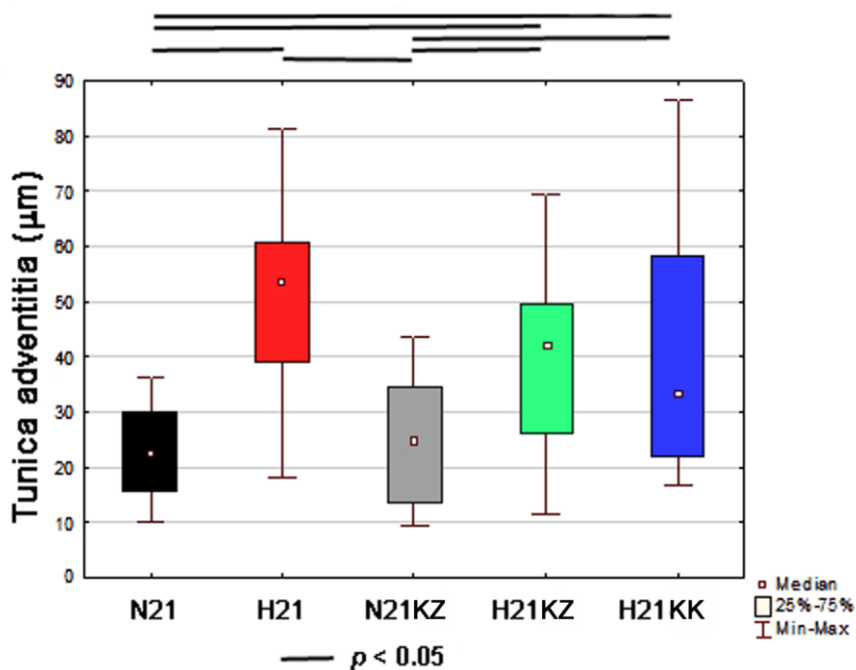


Obr. 28: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny N21. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

U skupiny H21 jsme zaznamenali symetrickou hypertrofii tunica media (Obr. 29a), která je u artérií s průměrem vyšším než 300 μm signifikantní oproti skupinám N21, N21KZ (Graf 8). Tunica adventitia je u této skupiny také zbytnělá, místy asymetricky, s patrným zmnožením vasa vasorum (Obr. 29a, černá šipka). Tato hypertrofie byla také kvantifikována jako signifikantní u artérií s průměrem vyšším než 300 μm oproti skupinám N21 a N21KZ (Graf 9).



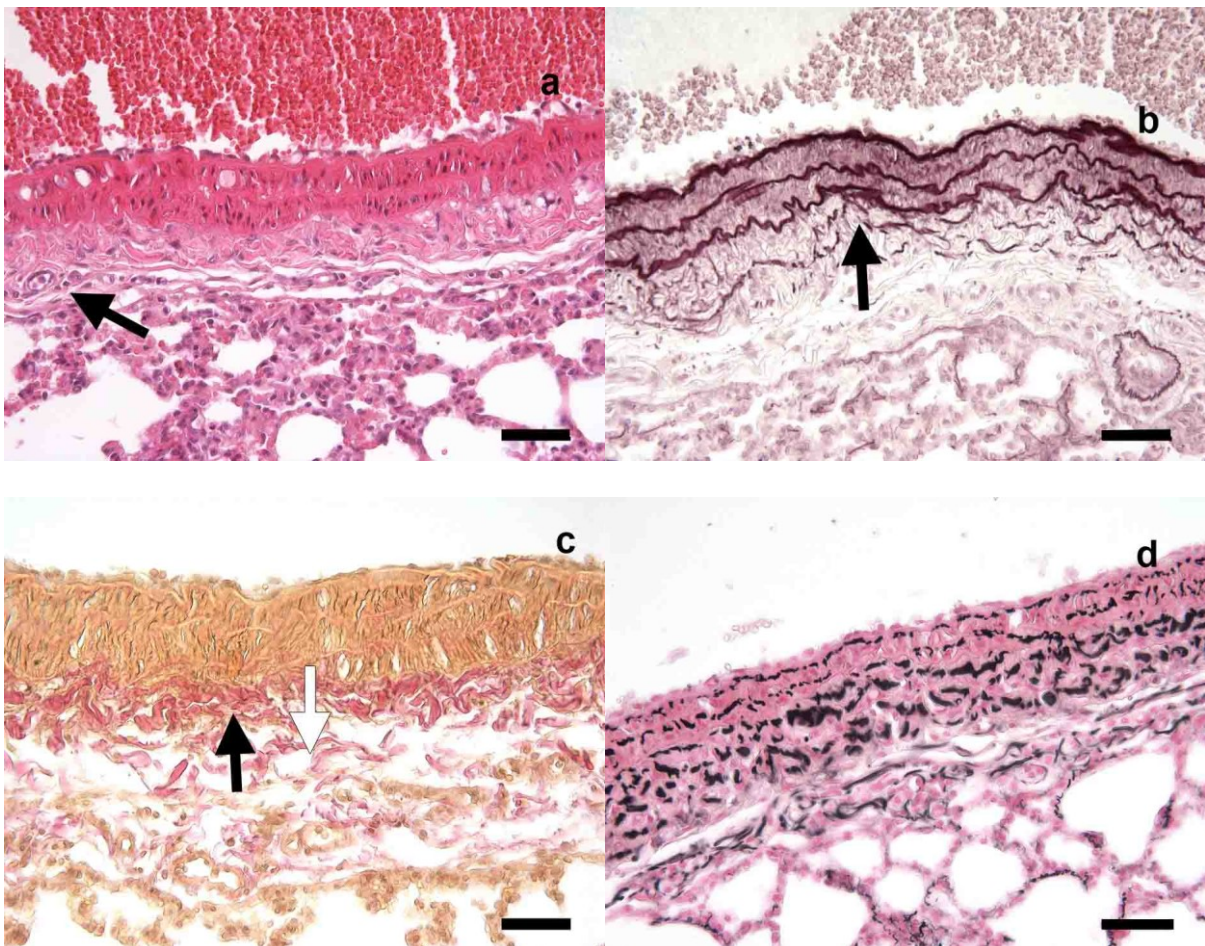
Graf 8: Průměrná tloušťka tunica media velkých vodivých artérií o průměru >300 μm v průběhu 21denní hypoxie.

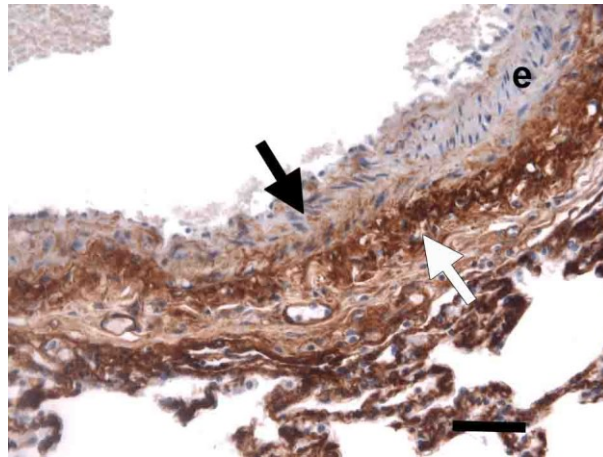


Graf 9: Průměrná tloušťka tunica adventitia velkých vodivých artérií o průměru >300 μm v průběhu 21denní hypoxie.

Elastické fenestrované membrány tunica media jeví často známky štěpení a větvení, dochází také ke zmnožení elastických vláken ve vnitřních vrstvách tunica adventitia

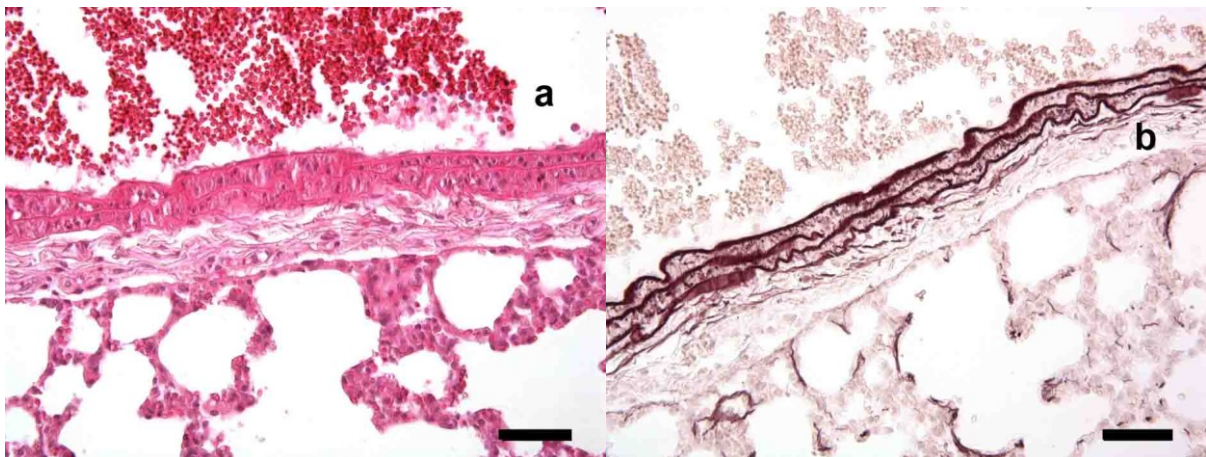
(Obr. 29b, černá šipka). Vlákna kolagenu I utváří v rozsahu tunica adventitia dvě vrstvy. Vnitřní s tlustými a zmnoženými vlákny (Obr. 29c, černá šipka) a zevní s tenkými a řídce uspořádanými vlákny (Obr. 29c, bílá šipka). Tyto dvě vrstvy vláken kolagenu I se vzájemně prolínají v místě svého kontaktu. Pozorovali jsme zmnožení retikulárních vláken v endomysiu a v tunica adventitia (Obr. 29d). Pozitivita kolagenu VI je v endomysiu pouze minimální (Obr. 29e, černá šipka), výraznější pak v rozsahu tunica adventitia s maximem ve vnitřní vrstvě a kolem vasa vasorum (Obr. 29e, bílá šipka).

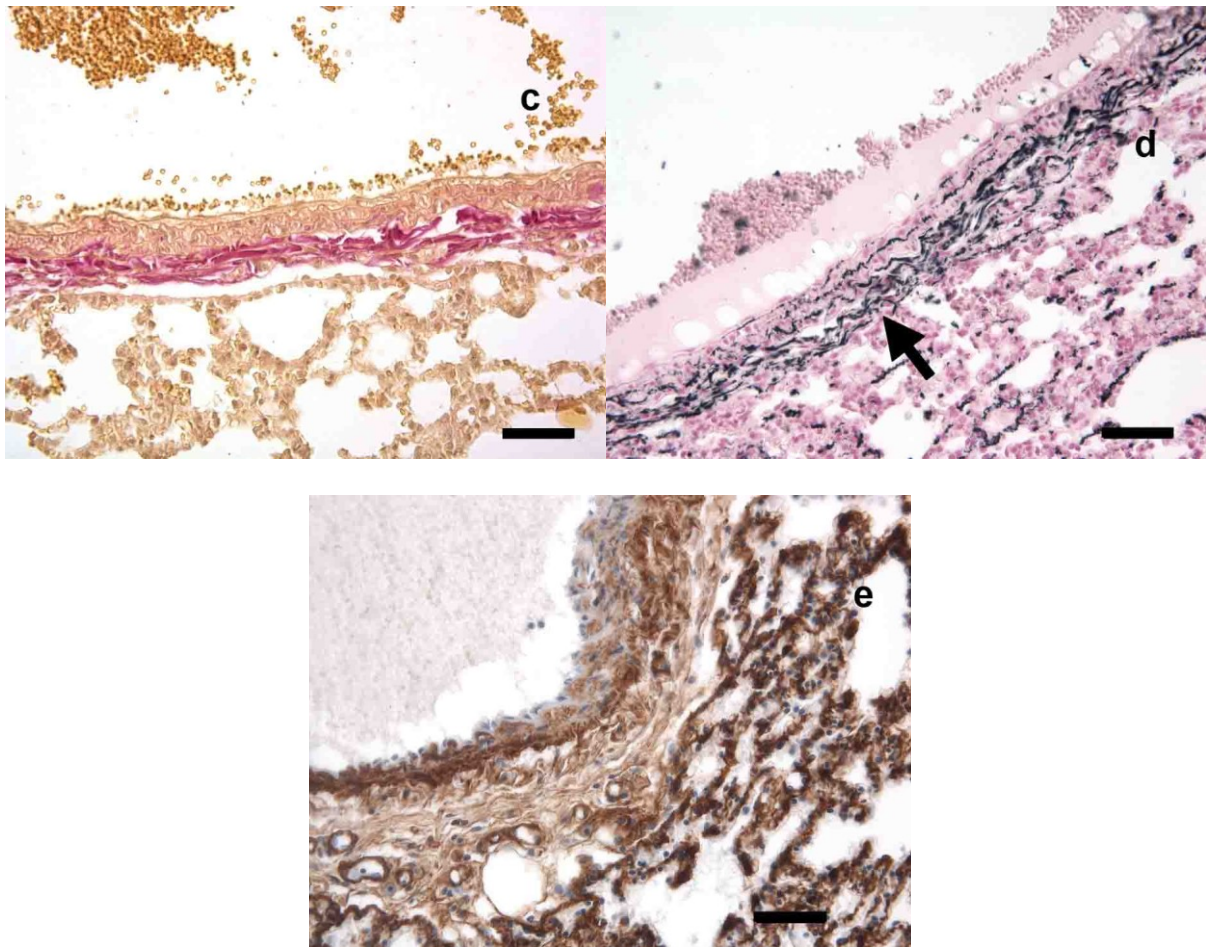




Obr. 29: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny H21. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Morfologie velkých vodivých artérií, uspořádání elastických membrán a vláken kolagenu I skupiny N21KZ odpovídá základnímu morfologickému nálezu u skupiny N21 (Obr. 30a,b,c). Odlišnosti jsme zaznamenali u vláken retikulárních, která jsou v rozsahu endomysia a tunica adventitia zmnožená a s patrnou fragmentací (Obr. 30d, černá šipka). Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezu skupiny N21 (Obr. 30e).

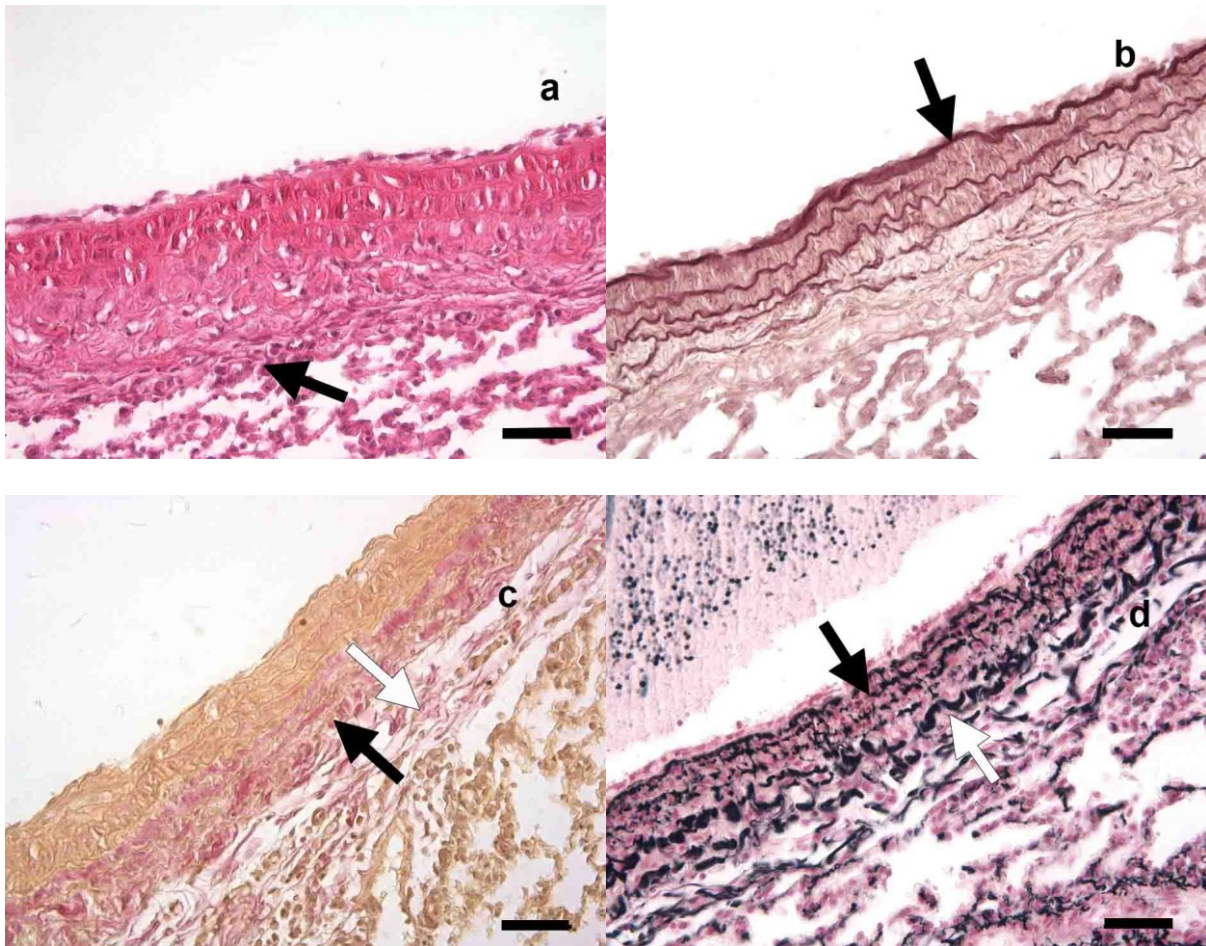


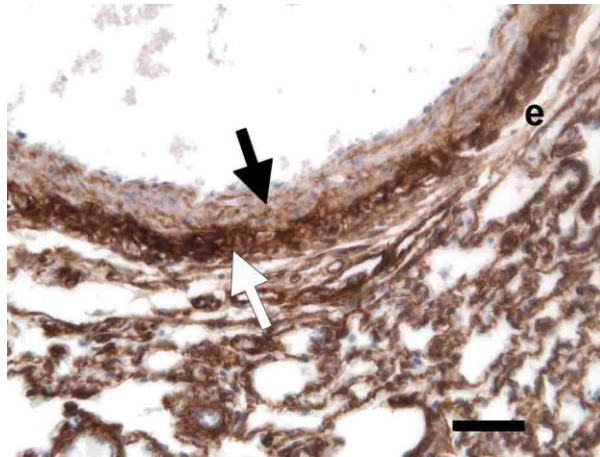


Obr. 30: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny N21KZ. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

U skupiny H21KZ jsme zaznamenali symetrickou hypertrofii tunica media (Obr. 31a), která je u artérií s průměrem vyšším než 300 μm signifikantní oproti skupinám N21, N21KZ (Graf 8). Tunica adventitia je u této skupiny také zbytnělá, místy asymetricky, s patrným zmnožením vasa vasorum (Obr 31a, černá šipka). Nárůst tloušťky byl také kvantifikován jako signifikantní u artérií s průměrem vyšším než 300 μm oproti skupinám N21 a N21KZ (Graf 9). Uspořádání fenestrovaných elastických membrán tunica media odpovídá nálezu skupiny H21, s odlišností membrana elastica interna, která je tenčí a bez známek štěpení a větvení (Obr. 31b, černá šipka). Elastická vlákna tunica adventitia jsou méně početná. Vlákna kolagenu I utvářejí v rozsahu tunica adventitia dvě vrstvy, vnitřní dominantní vrstvu s tlustými a početnými vlákny

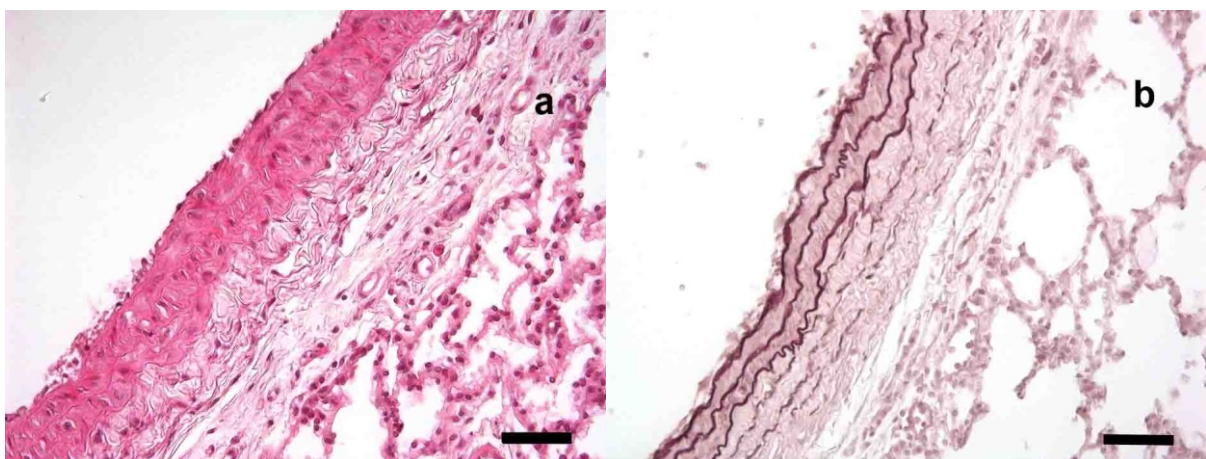
(Obr. 31c, černá šipka) a zevní vrstvu s tenčími a řídce uspořádanými vlákny (Obr. 31c, bílá šipka). Zmnožení retikulárních vláken jsme zaznamenali v endomysiu (Obr. 31d, černá šipka) a v tunica adventitia s patrnou fragmentací. Tunica adventitia jeví vnitřní vrstvu retikulárních vláken, která byla poněkud tlustší (Obr. 31d, bílá šipka). Pozitivita kolagenu VI je v endomysiu (Obr. 31e, černá šipka) a dále pak v rozsahu tunica adventitia (Obr. 31e, bílá šipka). Pozitivita endomysia je silnější než u skupiny H21, avšak slabší než u skupiny N21.

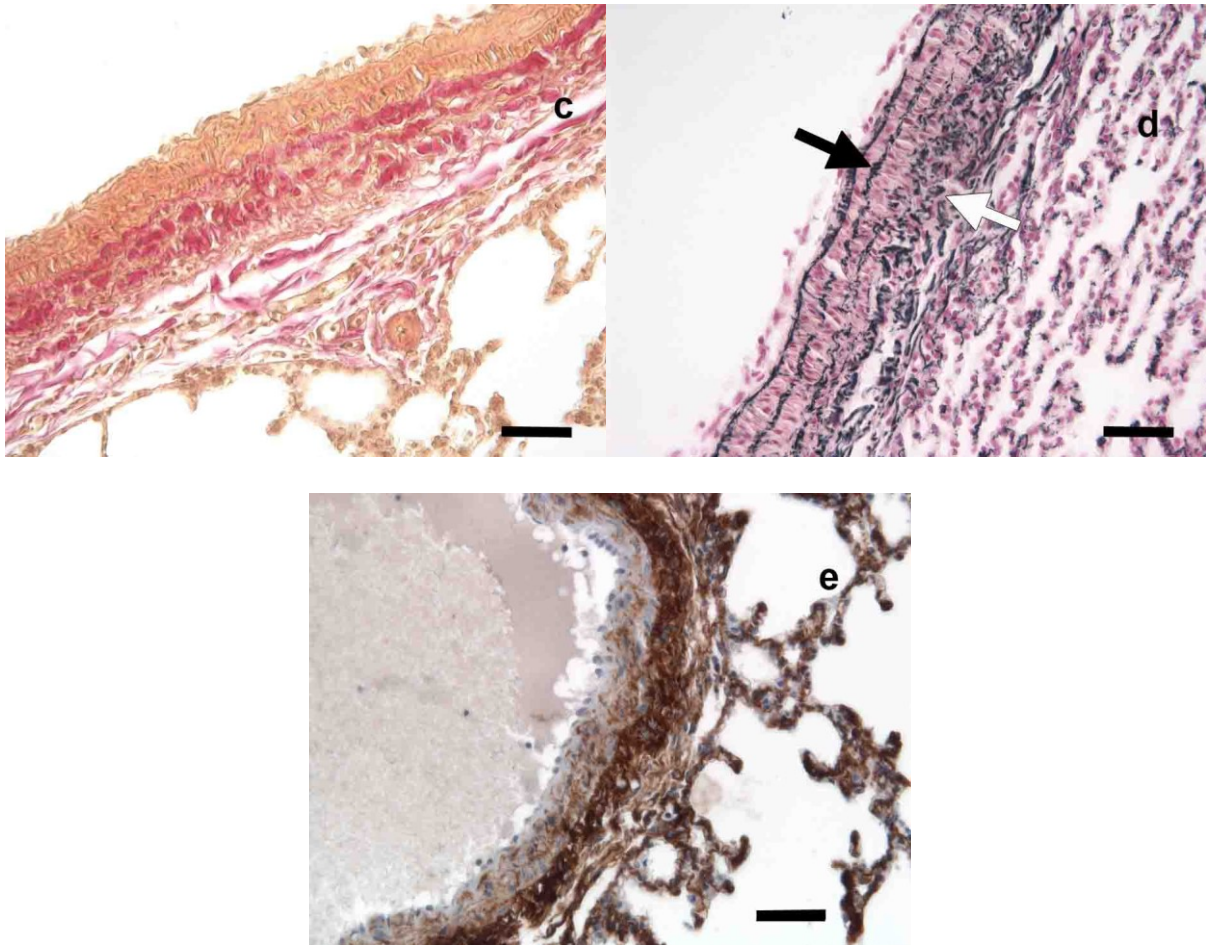




Obr. 31: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny H21KZ. (měřítko = 50 μ m). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

Morfologie velkých vodivých artérií, uspořádání elastických membrán, elastických a vláken kolagenu I u skupiny H21KK odpovídá základnímu morfologickému nálezu u skupiny H21 (Obr. 32a,b,c). Odlišnosti jsme zaznamenali pouze u membrana elastica interna, která je tenčí, bez větvení a štěpení. Vlákná retikulární jsou v endomysiu (Obr 32d, černá šipka) a v tunica adventitia (Obr 32d, bílá šipka) mírně zmnožená a s patrnou fragmentací. Pozitivita kolagenu VI odpovídá nálezu skupiny H21 (Obr. 32e).

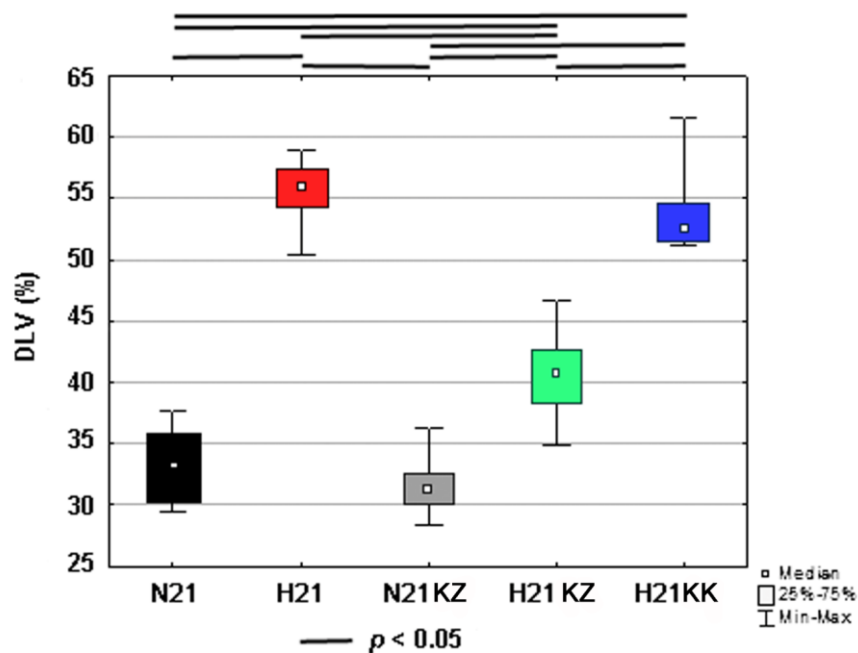




Obr. 32: Morfologie velkých vodivých artérií u skupiny H21KK. (měřítko = 50 μm). a) Hematoxylin-eosin, b) Orcein, c) Van Gieson, d) Gomori, e) IHCH anti-Collagen VI.

5.2.4. Změny v procentuálním zastoupení “Double laminated vessels”

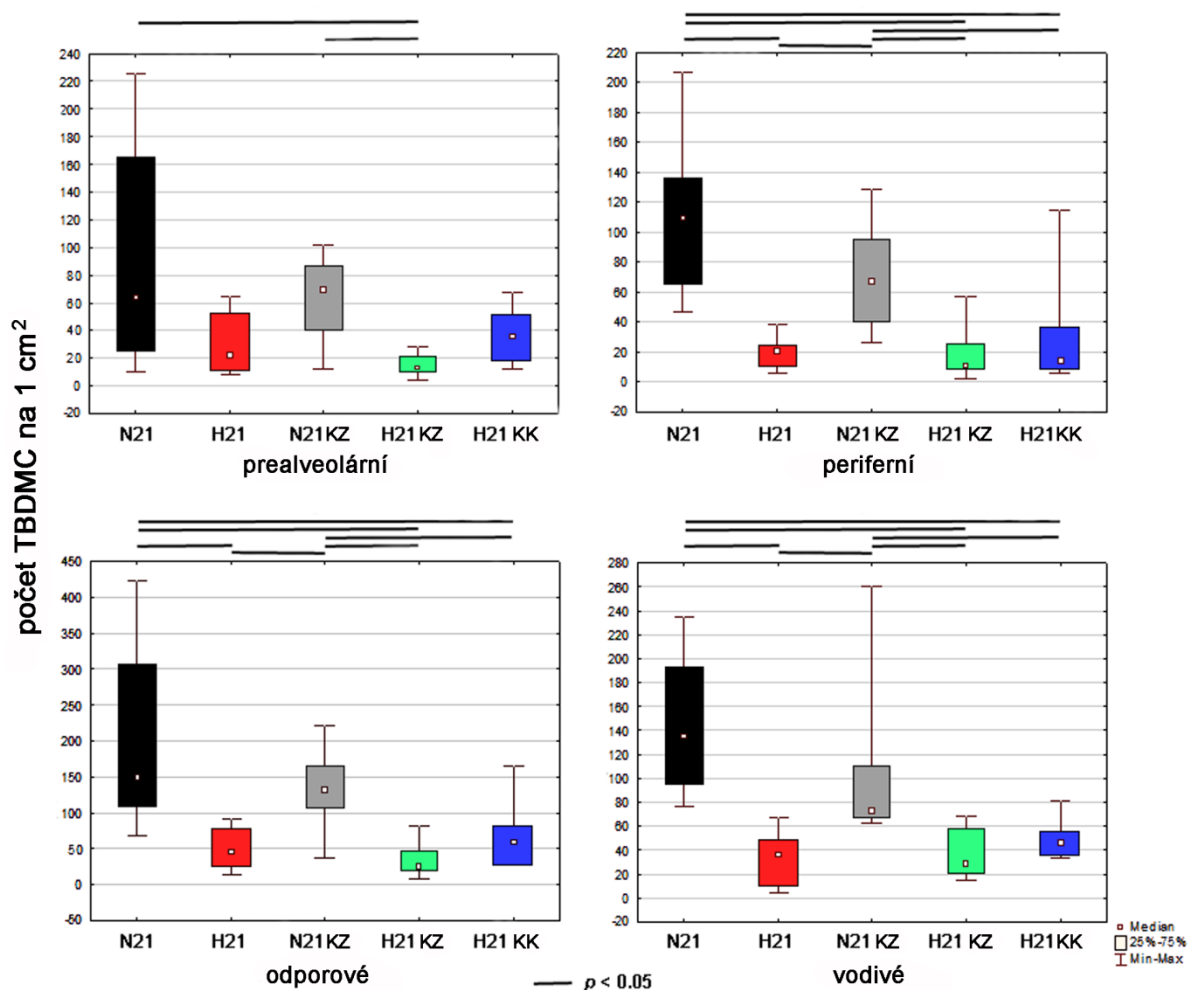
21denní hypoxie u skupiny H21 vedla k signifikantnímu nárůstu v procentuálním zastoupení DLV oproti kontrolním normoxickým skupinám N4 a N4K, ale také oproti skupině H21KZ. Rozdíl mezi skupinou H21 a H21KK zaznamenán nebyl, také jsme nezaznamenali rozdíl mezi skupinou N21 a N21KZ. U skupiny H21KZ byl pak signifikantní nárůst v procentuálním zastoupení DLV oproti kontrolním normoxickým skupinám N4 a N4K (Graf 10).



Graf 10: Změny v procentuálním zastoupení DLV v průběhu 21 denní hypoxie.

5.2.5. Změny v distribuci toluidinovou modří detekovatelných žírných buněk

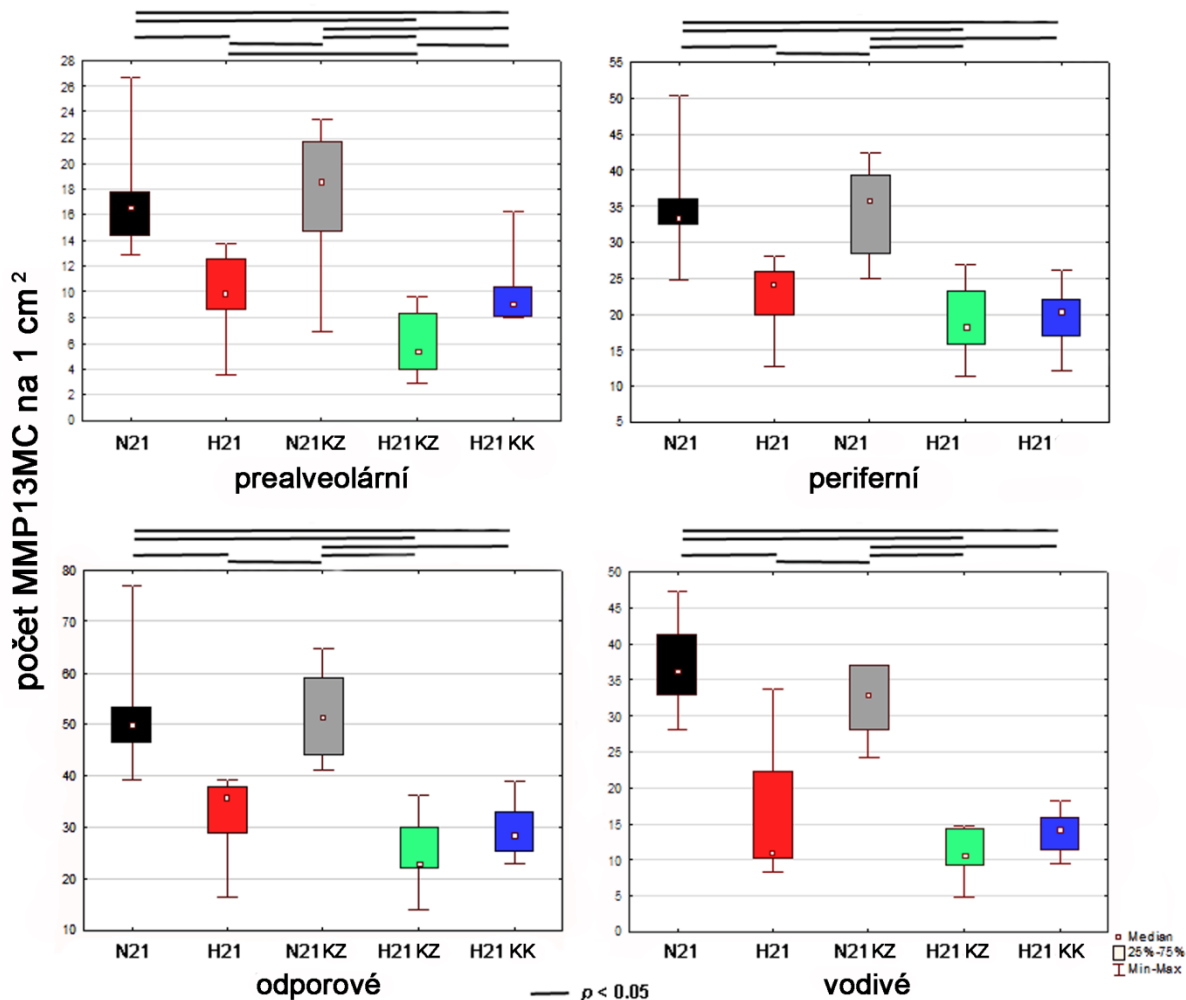
Na úrovni prealveolárních artérií jsme zaznamenali pokles počtu TBDMC u skupiny H21KZ oproti skupinám N21 a N21KZ. U periferních osvalených artérií, odporových artérií a velkých vodivých artérií byl zaznamenán signifikantní pokles počtu TBDMC u skupiny H21, H21KZ a H21KK oproti skupinám N21 a N21KZ (Graf 11).



Graf 11: Změny v distribuci TBDMC jednotlivých kategorií plicních artérií v průběhu 21denní hypoxie. a) Prealveolární artérie, b) Periferní osvalené artérie, c) Periferní odporové artérie, d) Velké vodivé artérie.

5.2.6. Změny v distribuci matrix metaloproteináza 13 pozitivních žírných buněk

Na úrovni prealveolárních artérií jsme zaznamenali signifikantní pokles v počtu MMP13MC u skupiny H21, H21KZ a H21KK oproti skupinám N21 a N21KZ, dále ale také pokles v počtu MMP13MC u skupiny H21KZ oproti skupinám H21 a H21KK. U periferních osvalených artérií, odporových artérií a velkých vodivých artérií byl zaznamenán signifikantní pokles počtu MMP13MC u skupiny H21, H21KZ a H21KK oproti skupinám N21 a N21KZ (Graf 12).

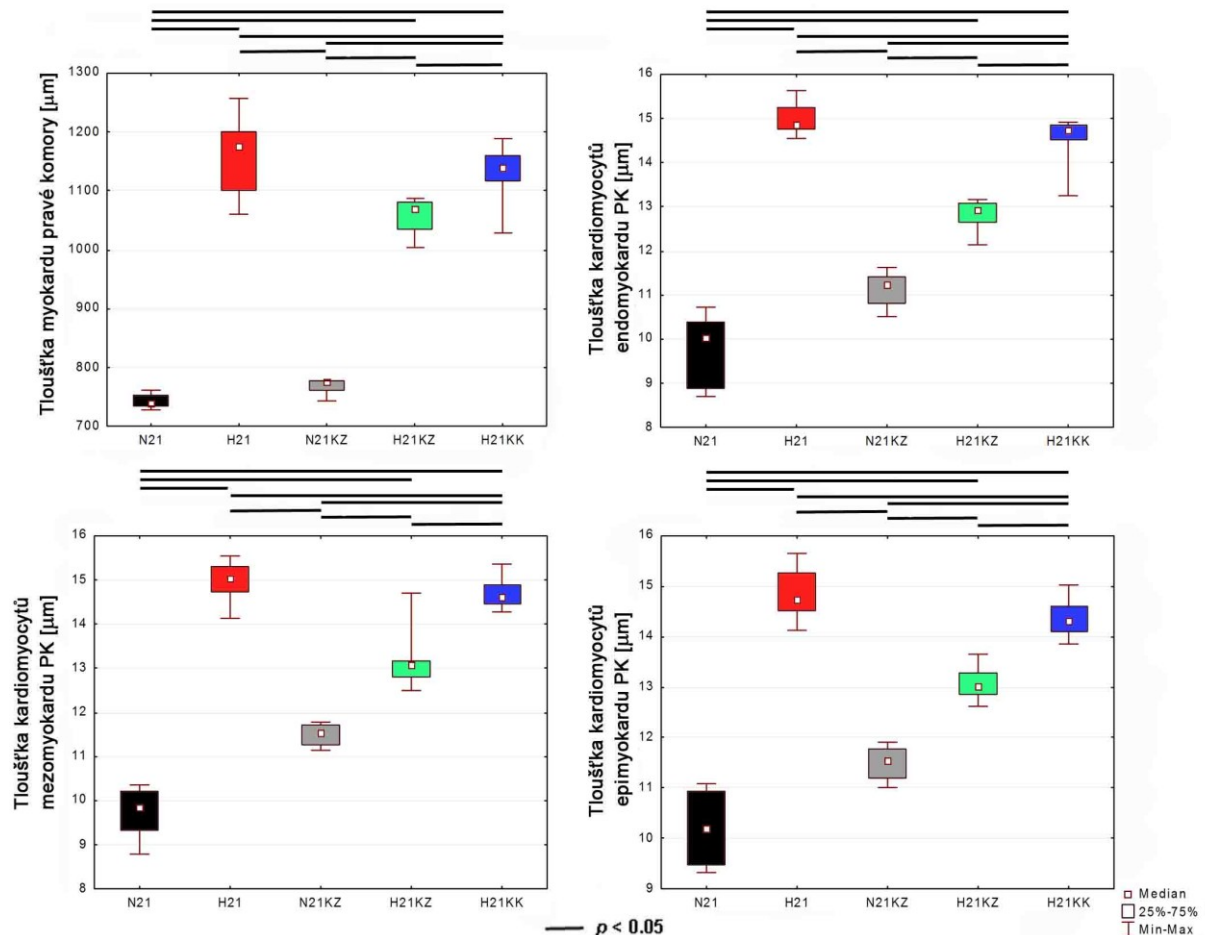


Graf 12: Změny v distribuci MMP13MC jednotlivých kategorií plicních artérií v průběhu 4denní hypoxie. a) Prealveolární artérie, b) Periferní osvalené artérie, c) Periferní odporové artérie, d) Velké vodivé artérie.

5.2.7. Morfometrické změny pravé komory srdeční

21denní hypoxie u skupiny H21, H21KZ a H21KK vedla k hypertrofii myokardu se signifikantním nárůstem tloušťky myokardu pravé komory srdeční oproti skupinám N21, N21KZ. U skupiny H21KZ jsme zaznamenaly omezení hypertrofie s menší tloušťkou myokardu pravé komory srdeční oproti skupinám H21 a H21KK (Graf 13a). Dále jsme zaznamenali hypertrofii s nárůstem tloušťky kardiomyocytů pravé komory srdeční ve vrstvě endomyokardu (Graf 13b), mesomyokardu (Graf 13c) a epimyokardu (Graf 13d) u skupiny H21, H21KZ a H21KK oproti skupinám N21 a

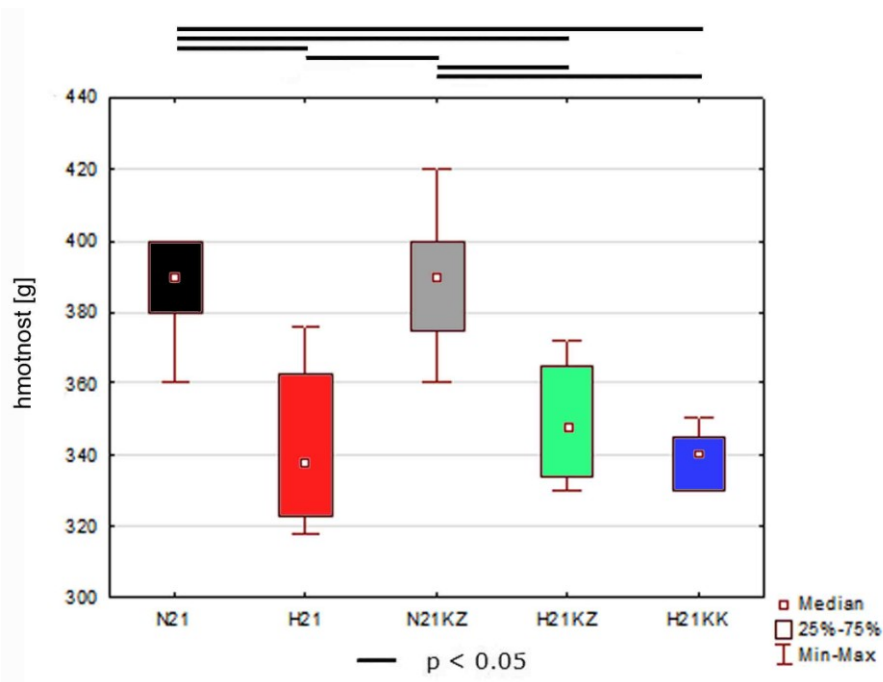
N21KZ. Omezení hypertrofie kardiomyocytů bylo patrné u skupiny H21KZ oproti skupinám H21 a H21KK.



Graf 13: Změny v tloušťce pravého myokardu a dále kardiomyocytů jednotlivých vrstev myokardu v průběhu 21denní hypoxie. a) Tloušťka pravého myokardu, b) Tloušťka kardiomyocytů pravého **endomyokardu**, c) Tloušťka kardiomyocytů pravého **mesomyokardu**, d) Tloušťka kardiomyocytů pravého **epimyokardu**.

5.2.8. Změny ve výsledné hmotnosti potkanů

Všichni potkani pokusu 21denní hypoxie zahajovali experiment s průměrnou hmotností $279 \pm 8\text{g}$. Skupiny vystavené hypoxii dosáhly signifikantně nižší průměrné hmotnosti s hodnotou $344 \pm 3\text{g}$, než skupiny normoxické, u kterých byla průměrná hmotnost $388 \pm 4\text{g}$ (Graf 14).



Graf 14: Průměrná hmotnost potkanů 21denního experimentu na konci pokusu.

6. DISKUZE

6.1. Vymezení zkoumané problematiky

Cílem experimentu bylo morfologicky detailně popsat změny a aspekty remodelace plicních artérií potkana v průběhu 4denní a 21denní hypoxie a zejména pak stav remodelace při současné terapii plicní hypertenze kromoglykátém sodným. Při posuzování základní morfologie plicních artérií jsme postupovali porovnáváním s fyziologickým nálezem – v našem případě skupiny N4 a N21, tedy skupiny kontrolní normoxické. Tento normální nález plicních artérií, včetně rozdělení cév v průběhu větvení na jednotlivé kategorie, byl do určité míry již popsán (Meyrick et al., 1978). Další práce se v minulosti věnovaly hypoxicko-remodelačním procesům plicních artérií a srdce. Byla tak již popsána logická hypertrofie pravé komory srdeční, muskularizace plicních arteriol, či hypertrofie tunica media periferních plicních artérií

(Leach et al., 1976; Williams et al., 1977). Přes řadu prací, které se věnovaly možnosti ovlivnit rozvoj a průběh hypoxické plicní hypertenze terapií kromoglykátém sodným (např. Dahal et al., 2011; Bartelds et al., 2012), nebyly doposud přesně popsány kvantitativní a kvalitativní morfologické změny plicních artérií a srdce potkana při této terapii. Tento výstup by měl být tedy hlavním a originálním úkolem celého experimentu.

6.2. Studie 1: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 4denní hypoxie

Po expozici potkana 4denní hypoxii dochází k zásadní remodelaci prealveolárních a periferních osvalených artérií. Tyto dvě skupiny cév tvoří dohromady skupinu periferních odporových artérií, které hrají pravděpodobně dominantní úlohu ve formování výsledné plicní hypertenze. Zaznamenaná neomuskularizace prealveolárních artérií a hypertofie tunica media periferních odporových artérií po 4 dnech hypoxie byla v konsensu s nálezem předchozích prací (Hislop et al., 1976). Tyto změny provázelo zmnožení kolagenních vláken v rozsahu tunica adventitia a dále zmnožení retikulárních vláken v endomysiu a tunica adventitia. Tyto vláknité složky mezibuněčné hmoty jsou pravděpodobně produkovány stimulovanými hladkými svalovými buňkami tunica media a fibroblasty tunica adventitia, na které v průběhu hypoxické expozice působí řada mediátorů, které jsou hypoxií přímo indukované. Jsou to enzymatické produkty žírných buněk jako tryptáza, chymáza a MMP-13 u potkanů (Tozzi et al., 1998; Pejler et al., 2010; Maxová et al., 2010). Dále pak cytokiny jako platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) a transforming growth factor β ,

kteře kromě stimulace hladkých svalových buněk, fibroblastů a endoteliů působí jako chemotaktický faktor pro žírné buňky (Kelley et al., 2000; Feltis et al., 2007). Další produkované faktory pak mění reaktivitu a míru odpovědi na tuto patologickou signalizaci (Tabima et al., 2010). A nakonec všeobecně známé produkty žírných buněk jako histamin a heparin, které ovlivňují buněčnou signalizaci mezi buňkami a dále mezi buňkami a mezibuněčnou matrix. Hypoxická remodelace periferních odporových artérií je provázena také formací zevní elastické membrány do obrazu DLV. Tato změna je u hypoxie natolik určující, že se nárůst v procentuálním zastoupení DLV považuje za známku proběhlé remodelace (Leach et al., 1977; Herget et al., 1978). V naší studii byl zaznamenán signifikantní nárůst v počtu DLV u skupiny H4 oproti skupinám N4 a N4K.

V průběhu hypoxické remodelace dochází dále ke změně v množství exprimovaného kolagenu VI v rozsahu stěny plicních artérií. Jedná se o širokou rodinu nefibrilárních kotevních proteinů, které mají v různých tkáních řadu funkcí. Spojují kolagen VI a perlekan s bazální membránou, dále pak jako kotevní protein zprostředkovávají vazbu buněk na různé součásti mezibuněčné hmoty, čímž pomáhají utvářet 3D architekturu tkání. Kolagen VI hraje také podstatnou roli v migraci hladkých svalových buněk a fibroblastů, čímž pomáhá v utváření finální struktury mezibuněčné hmoty, zejména při různých remodelačních dějích (Fitzgerald et al., 2013; Mak et al., 2014; Cescon et al., 2015). Literatura popisuje například zvýšenou pozitivitu kolagenu VI v myokardu při remodelaci infarktového ložiska a diskutuje možnost jeho použití jako markeru remodelace (Dinh et al., 2009). Dále byla popsána snížená přítomnost kolagenu VI v hladkých svalových buňkách velkých vodivých artérií v průběhu hypoxie (Žaloudíková et al., 2017). V naší práci jsme u skupiny N4 na úrovni

prealveolárních artérií zaznamenali mírnou pozitivitu v rozsahu endomysia, která výrazně vzrostla, ještě s pozitivitou v tunica adventitia u skupiny H4. Tato místa se zvýšenou expresí kolagenu VI lze pokládat za místa s nejvýraznější remodelační aktivitou, ke které dochází při neomuskularizaci tunica media a excesivní tvorbě vláknité složky mezibuněčné hmoty v celém rozsahu stěny prealveolárních artérií. U skupiny H4K nebyl tento nárůst positivity patrný. Hypotézu o užití positivity kolagenu VI jako ukazatele remodelačních změn s tvorbou vláknité složky mezibuněčné hmoty a hyperplasie tento nálezní potvrzuje. Na úrovni periferních osvalených artérií byla u skupiny N4 pozitivita kolagenu VI v rozsahu endomysia a tunica adventitia. Pozitivita výrazně poklesla v endomysiu skupiny H4 a naopak vzrostla v tunica adventitia. Tento nálezní vysvětlujeme tak, že zde již nedochází k hyperplasii hladkých svalových buněk tunica media jako u prealveolárních artérií, ale pouze k popsané hypertrofii. Předpokládáme, že buňky se ve svých proteosyntetických drahách začaly dominantně orientovat na tvorbu intracelulárních produktů nutných k hypertrofii a syntéza kolagenu VI je tak omezena. U skupiny H4K byl nálezní positivity kolagenu VI v rozsahu endomysia vyšší než u skupiny H4, ale nižší než u skupiny N4. Tento výsledek potvrzuje morfologický a morfometrický nálezní omezení hypoxické remodelace. Nálezní zvýšené positivity kolagenu VI v tunica adventitia u skupiny H4 považujeme za projev a součást zvýšené produkce komponent mezibuněčné hmoty v rámci remodelace.

Morfologické změny velkých vodivých artérií nebyly doposud příliš posuzovány, protože se předpokládá, že nehrají dominantní úlohu ve formování výsledného tlaku plicního oběhu. V naší práci jsme se pro celistvost posuzování arteriálního řečiště plic potkana zaměřili i na tuto kategorii. Zaznamenali jsme oblasti ztluštělé tunica

adventitia se zmnožením vasa vasorum. Je pravděpodobné, že jsou tyto změny také indukovány působením VEGF, tak jak to bylo již v některých pracích popsáno u astmatu (Feltis et al., 2007). Další autor popsal výrazný nárůst vasa vasorum v tunica adventitia spojený s perivaskulární extravazací v průběhu hypoxie (Davie et al., 2004). Nárůst tloušťky tunica adventitia u artérií skupiny H4 s průměrem $>300 \mu\text{m}$ v porovnání se skupinami N4 a N4K byl signifikantní. Nárůst tloušťky tunica media signifikantní nebyl. Vzhledem k objemu této vrstvy však nebyla větší signifikantní hypertrofie solidní svalové vrstvy po 4 dnech pokusu ani předpokládána. V rozsahu stěny velkých vodivých artérií došlo při hypoxii ke změnám v morfologii vláknité složky mezibuněčné hmoty. Konkrétně pak zmnožení a jisté dezorganizace elastických fenestrovaných membrán, zmnožení vláken kolagenu I v rozsahu tunica adventitia a zmnožení retikulárních vláken v tunica media a tunica adventitia. Tyto změny přisuzujeme opětovně výrazné stimulaci hladkých svalových buněk, fibroblastů a endotelií hypoxií indukovanými faktory. Pozitivita kolagenu VI byla na úrovni velkých vodivých artérií u skupiny N4 patrná v endomysiu a dále v tunica adventitia. Po expozici hypoxii u skupiny H4 pozorujeme pokles positivity v tunica media a nárůst positivity v tunica adventitia. Tyto změny diskutujeme stejně jako u periferních osvalených artérií. Pokles positivity v tunica media jako důsledek snížené intracelulární produkce při hypoxické hypertrofii hladkých svalových buněk, zvýšený nález v tunica adventitia jako projev zvýšené tvorby a strukturální přestavby mezibuněčné hmoty. Domníváme se, že kromě již literárně zmíněné možnosti použití diagnostiky kolagenu VI jako markeru remodelace, je možné jej dobře použít jako pozitivní marker hyperplasie, a do určité míry jako negativní marker hypertrofie.

U skupiny H4 byl zaznamenán nárůst v tloušťce myokardu pravé komory srdeční a dále kardiomyocytů endomyokardu a mesomyokardu pravé komory oproti skupinám N4 a N4K. Výsledek nám přinesl důkaz o tom, že námi navozená hypoxie vedla efektivně k rozvoji hypoxické plicní hypertenze. V literatuře jsme zaznamenali pouze pokus, který sledoval podrobně remodelace levé komory u systémové hypertenze po minimálně pěti týdnech. V tomto případě byla hypertrofická odpověď nejvyšší u vrstvy epimyokardu, kdy autor popsal nejvyšší hypertrofický potenciál u vrstvy s nejmenšími kardiomyocyty – tedy vrstvy epimyokardu levé komory (Campbell et al., 2013). Dá se však předpokládat rozdílná morfologie u pravé komory, kdy v našem pokusu byla průměrná tloušťka kardiomyocytu u vrstvy epimyokardu naopak nejvyšší. S tím však adekvátně koreloval výsledek, kdy jsme u kardiomyocytů epimyokardu po 4 dnech pokusu hypertrofii vůbec nezaznamenali, na rozdíl od vrstvy endomyokardu a mesomyokardu.

Po terapii kromoglykátém sodným u skupiny H4K byla remodelace výrazně omezena. Podle literárních údajů dochází po terapii k fosforylaci a shlukování proteinu moesinu kolem sekrečních granul žírných buněk, čímž se zamezí možnosti jejich degranulace, a tím uvolnění enzymů a biologicky aktivních látek do jejich okolí ve stěně plicních artérií (Theoharides et al., 2000). Jelikož považujeme degranulační produkty žírných buněk, zejména pak MMP-13, za určující v hypoxické remodelaci plicních artérií, omezení přestavby po terapii by mělo být logickým následkem. Neomuskularizaci prealveolárních arteí a hypertrofii tunica media periferních osvalených artérií jsme nezaznamenali. Stejně tak nedošlo k nárůstu v procentuálním zastoupení DLV jako morfologického markeru hypoxické remodelace plicních artérií. Struktura kolagenu I a elastických vláken se oproti skupině N4 nezměnila. Pozitivita

kolagenu VI byla u velkých vodivých artérií skupiny H4K podobná jako u skupiny periferních osvalených artérií. Nalézáme pozitivitu kolagenu VI v rozsahu endomysia, která je nižší než u skupiny N4, avšak vyšší než u skupiny H4. Pozitivita v tunica adventitia odpovídá nálezům skupiny N4. V tunica adventitia periferních odporových artérií byla zaznamenána fragmentace retikulárních vláken. S tímto stavem jsme se setkali v našem experimentu u všech skupin léčených kromoglykátém sodným, dokonce i u skupin normoxických s terapií (N4K a N21KZ). Předpokládáme, že zablokováním degranulace žírných buněk kromoglykátém sodným dojde k narušení rovnováhy mezi produkcí a štěpením kolagenu. To následně mění rovnováhu a signalizace v mezibuněčné hmotě, která se v našem případě u skupin N4K a N21KZ projevila pouze fragmentací retikulárních vláken. Produkty žírných buněk se průkazně uplatňují v řízení obratu kolagenu jak za fyziologických podmínek, tak v průběhu hypoxie (Novotná et al., 2002). Proteázy žírných buněk jsou podstatné v remodelaci mezibuněčné hmoty (Nielsen et al., 2008) a štěpení kolagenu (Greenlee et al., 2007). Cytokiny žírných buněk stimulují fibroblasty a hladké svalové buňky k produkci kolagenu (Kelley et al., 2000). Tyto zmíněné obraty mohou být blokovány po stabilizaci žírných buněk i v normoxii, či za jiných patologických stavů. Nastiňuje to poznatek práce, která popisuje narušení kolagenního obratu s nárůstem množství tenkých kolagenních fibril u invazivního karcinomu prsu po absenci MMP-13 (Nielsen et al., 2008). Žírné buňky mohou být aktivovány také cestou signalizace NO a reaktivními sloučeninami kyslíku (Swindle et al., 2004). Fragmenty kolagenu I stejně jako degradační produkty kolagenu po oxidaci a nitraci stimulují fibroblasty a hladké svalové buňky k proliferaci a produkci extracelulární matrix. V testu hypotézy, že oxidační poškození bylo kritické pouze v počáteční fázi rozvoje hypoxické plicní hypertenze, byl v literatuře experimentálním potkanům aplikován N-acetylcystein na

počátku a v průběhu chronické hypoxie – tento experiment vedl k signifikantnímu poklesu v procentuálním zastoupení DLV oproti kontrolní skupině (Lachmanová et al., 2005). Nové poznatky v této oblasti by mělo přinést posouzení našeho experimentu elektronovou mikroskopií, kterou plánujeme provést do budoucna.

Dalším posuzovaným parametrem v pokusu 4denní hypoxie byly změny v počtu periarteriálních žírných buněk, kdy jsme granula detekovali jak pomocí toluidinové modři (TBDMC), tak pomocí IHCH proti MMP13 v granulech žírných buněk (MMP13MC). Zaznamenali jsme pokles v počtu TBDMC a MMP13MC u skupiny 4denní hypoxie H4. Pokles počtu MMP13MC byl omezen terapií kromoglykátém sodným u skupiny H4K. Trend změny počtu periarteriálních žírných buněk v průběhu hypoxie byl odlišný oproti výsledku předchozí práce našeho ústavu (Vajner et al., 2006). Lze se domnívat, že k odlišným výsledkům došlo na základě rozdílné reaktivity žírných buněk a odlišným načasováním degranulace u jednotlivých kmenů potkanů. Tato mezikmenová variabilita je v literatuře již popsána u potkanů a myší (Majeed, 1994a, 1994b). Další hypotézou diskuse je výrazná dynamika možných výsledků mezi 3. a 7. dnem hypoxie (Meyrick et al., 1979). Jestliže nebyl metodický postup předchozího a současného experimentu zcela identický, mohlo dojít k odlišnostem ve výsledcích. Další možností je odlišnost výsledku vlivem rozdílného způsobu navození hypoxie, kdy řada předchozích experimentů zabývajících se hypoxií, navozovalo toto prostředí v hypoxických komorách, které musely být v průběhu experimentu otvírány z důvodu péče o potkany. Takový experiment lze pak do jisté míry považovat za pokus s intermitentní hypoxií, která je odlišná od našeho pokusu. Námi použitá hypoxická komora AV ČR je dostatečně prostorná, aby byla přes přechodovou komoru přístupná experimentátorovi. Není tedy za celý pokus

nutné hypoxii přerušovat. Právě možné rozdíly mezi intermitentní a kontinuální hypoxií byly již v literatuře zaznamenány (Leach et. al, 1976). Podle našeho názoru dochází hypoxií k degranulaci žírných buněk, a tím také ke ztrátě možnosti vizualizace jejich granul toluidinovou modří a MMP13. Tím si vysvětlujeme pokles počtu TBDMC a MMP13MC u skupiny H4. Terapie kromoglykátém sodným tuto degranulaci omezuje, proto nedochází ke ztrátě možnosti jejich vizualizace, a tím ke snížení jejího zaznamatelného počtu. Výsledky dále naznačují, že blok degranulace není kompletní, protože u skupiny prealveolárních a velkých vodivých artérií byl, i přes terapii, zaznamenaný jistý signifikantní pokles počtu MMP13MC. Počet MMP13MC byl u skupiny H4K na úrovni prealveolárních a velkých vodivých artérií vždy nižší než u skupiny N4 a N4K, avšak signifikantně vyšší u skupiny H4K než u skupiny H4 na úrovni artérií odporových i velkých vodivých. Signifikantní důkaz omezení bazální degranulace žírných buněk u skupiny N4K oproti skupině N4 zaznamenaný nebyl i přesto, že nesignifikantní trendy výsledků byly pravidlem. Této hypotéze nasvědčují také morfologické nálezy jistých odlišností u skupiny N4K oproti skupině N4, které byly diskutovány výše. Jistý důkaz naší hypotézy by měl přinést pokus vizualizace žírných buněk přes markery membrán pomocí c-kit (CD 117) IHCH, nebo lépe FcεR1 IHCH (Heneberg et al., 2011), který jsme v našem pokusu zatím neprovedli. V literatuře jsou již výsledky, které stanovily nárůst počtu žírných buněk v tunica adventitia plicních artérií v průběhu hypoxie a v průběhu posthypoxického zotavení u idiopatické plicní hypertenze (Davie et al., 2004; Montani et al., 2011). Kvalitativní nálezy u skupiny H4K byly potvrzeny kvantifikací změny procentuálního zastoupení DLV, kdy při terapii kromoglykátém sodným nebyl nalezen rozdíl oproti skupině N4 a N4K. Efekt terapie v podobě omezení rozvoje remodelace plicních artérií při hypoxické plicní hypertenzi byl tímto dokázán. K podpoře důkazu o

funkčním efektu terapie jsme zjišťovali změny v tloušťce kardiomyocytů jednotlivých podvrstev myokardu pravé komory a dále změny v tloušťce pravé komory. Přes všechny diskutabilní interpretační odchylky plicní morfologie by měla být tato exaktní metoda důkazem jednoznačným. U skupiny H4K nedošlo k žádné změně v morfometrii kardiomyocytů pravé komory a v tloušťce celé pravé komory oproti skupinám N4 a N4K.

Na úrovni velkých vodivých artérií po terapii kromoglykátém sodným došlo k zmenšení nárůstu tloušťky tunica adventitia oproti skupině H4. Přesto je zde však zaznamenaný nárůst oproti skupině N4 a N4K. Také zde byl, jako u skupiny H4, patrný nárůst počtu vasa vasorum v rozsahu tunica adventitia. Lze tedy dovozovat, že v průběhu hypoxie jsou v remodelaci velkých vodivých artérií efektivní výrazněji i další faktory uvolňované v souvislosti s hypoxií – viz výše. Stejně jako u ostatních skupin léčených kromoglykátém sodným jsme zaznamenali fragmentaci retikulárních vláken ve stěně artérií.

V konsensu s obdobnými experimenty v literatuře jsme potvrdili pokles průměrné tělesné váhy potkanů vystavených hypoxii bez ohledu na terapii kromoglykátém sodným. Tedy že dominantním faktorem stresu je pro potkany hypoxie, nikoliv každodenní intraperitoneální aplikací kromoglykátu sodného (Lachmanová et al., 2005; Baňasová et al., 2008).

6.3. Studie 2: Morfologické změny kardiopulmonálního krevního řečiště potkana v průběhu 21denní hypoxie

Cílem této studie bylo pokračování v objasnění morfologických změn plicních artérií potkana v průběhu 21denní hypoxie a dále histologických změn na těchto cévách po terapii kromoglykátém sodným. Jak bylo zmíněno, dominantní hypoxicko-remodelační děje plicních artérií se odehrávají v prvních dvou týdnech hypoxické expozice, kdy probíhá řada výše zmíněných patologických drah, indukujících tyto přestavby.

Morfologické nálezy na plicních artériích po 21 dnech hypoxie u skupiny H21 byly logickým pokračováním remodelace u skupiny H4 z předchozí studie, kdy byly tyto změny teprve zahájeny a patrně poprvé detekovatelné (Paddenberg et al., 2007). Po třech týdnech hypoxické remodelace jsme zaznamenali výraznou muskularizaci prealveolárních artérií a dále pokročilou asymetrickou hypertrofii tunica media periferních osvalených artérií. Tyto změny odporových plicních artérií vedly k formaci membrana elastica externa a utváření obrazu DLV. Nárůst procentuálního zastoupení DLV byl u skupiny H21 signifikantní oproti skupinám kontrolním normoxickým N21 a N21KZ. Na úrovni velkých vodivých artérií jsme zaznamenali hypertrofii a signifikantní nárůst tloušťky tunica media a tunica adventitia v konsenzu s výsledky v literatuře (Meyrick et al., 1980). Hypoxická remodelace periferních osvalených artérií vedla k formaci trilaminárního uspořádání tunica adventitia. Toto nově vzniklé uspořádání přisuzujeme edému tunica adventitia, který může být zapříčiněn v literatuře popsány konstriktivními lézemi této kategorie artérií v průběhu hypoxie (Pietra et al., 2004). Tato morfologie je odlišná od fyziologického

uspořádání tunica adventitia velkých vodivých artérií, které si zachovávají fyziologické bilaminární uspořádání navzdory 21denní hypoxii, v souladu s uznávanou literaturou, která rozlišuje tuto bilaminaritu a zavádí popisné označení tunica adventitia a tunica externa (Witter et al., 2016). Po 21.dnu hypoxie jsou pravděpodobně veškeré možné hypoxické remodelace plicních artérií kompletní (Semenza et al., 2001), všechny aspekty přestaveb jsou morfologicky detekovatelné a genová exprese je již upravena v návaznosti na expozici chronické hypoxii (Semenza et al., 1985). Nálezy positivity kolagenu VI v rozsahu stěn jednotlivých kategorií plicních artérií odpovídají nálezům u skupiny H4.

Terapie kromoglykátém sodným v prvních 4 dnech hypoxie u skupiny H21KZ pozměnila výsledný morfologický nález po 21denním pokusu. Remodelační změny byly zaznamenatelné, avšak byly modifikovány a zpomaleny oproti skupině H21. To dokazuje také výsledek procentuálního zastoupení DLV, které bylo u skupiny H21KZ signifikantně vyšší než u skupiny kontrolní normoxické N21, avšak nižší než u skupiny H21. Muskularizace prealveolárních artérií a hypertrofie tunica media periferních osvalených artérií byla symetrická, bez utváření obrazu šikmých segmentů. Určitá, i když modifikovaná přestavba zde však již probíhá. To přisuzujeme pravděpodobně krátkodobému terapeutickému efektu kromoglykátu sodného (Neale et al., 1986). Aktivaci remodelačních změn naznačují i výsledky positivity kolagenu VI, které u jednotlivých kategorií plicních artérií již více připomíná nálezy u skupiny H21, i když méně výrazné. Vzhledem k nálezu tedy usuzujeme, že iniciální kroky hypoxické remodelace a signalizace podmiňují další postup této kaskády. V případě její změny, jako v našem případě stabilizací žírných buněk, probíhá remodelace nadále modifikovaně a ani po delší době nedojde symetrie s

neléčenou hypoxickou skupinou. Zaznamenané změny vláknité složky mezibuněčné hmoty v podobě zmnožení a ztlustění kolagenních vláken ve stěně plicních artérií, popsaná formace vrstev tunica adventitia a fragmentace retikulárních vláken jsou v konsenzu s nálezem 4denního pokusu a byly diskutovány výše. V rozvoji těchto změn se zde pravděpodobně uplatňuje také rozvoj edému tunica adventitia spolu se zmnožením vasa vasorum, které pozorujeme u všech skupin léčených kromoglykátém. V diskusi studie 1 jsem zmiňoval možné narušení bazální sekrece žírných buněk. V literatuře již byl popsán případ, kdy změna fyziologické aktivity kolagenáz vedla k fragmentaci retikulárních vláken v endometriu (Xu et al., 2013), je otázka, zda je tento model obecně přenositelný na plicní patologii. Dále se tento nález kříží s doposud uznávanou teorií o potencované, chronickou hypoxií indukované angiogenezi (Wernersson et al., 2014), kdy u skupin léčených kromoglykátém byla angiogeneze v podobě zmnožení vasa vasorum ještě intenzivnější. Otázkou pak tedy je, zda tyto morfologické nálezy vznikají z pouhého zablokování periarteriálních žírných buněk. Populace žírných buněk je poměrně heterogenní skupina (Cruse et al., 2016) obsahující variabilní množství vysoce a nízce elektronově denzního materiálu ve svých granulech (Howell et al., 2003). Je pravděpodobné, že existují rozdíly v možnostech stabilizace granul proti degranulaci. Tomu nasvědčuje také rozdílnost v možnosti stabilizace například plicních, slizničních či peritoneálních žírných buněk (Finn et al., 2013). Nelze tedy například vyloučit možný vliv peribronchiálních žírných buněk, které mohou mít odlišnou odpověď na naši terapii a které se vyskytují v bezprostřední blízkosti velkých vodivých a periferních muskularizovaných artérií v rámci tracheobronchiálního stromu. Tato teorie by mohla být posouzena kvantifikací peribronchiálních TBDMC a MMP13MC. Nárůst tloušťky tunica adventitia a tunica media skupiny H21KZ proběhl

bez rozdílu oproti skupině H21. Důvodem je pravděpodobný efekt dalších hypoxií indukovaných faktorů – viz výše.

Terapie kromoglykátém sodným v posledních 4 dnech 21denní hypoxie neměla výrazný efekt na finální morfologii plicních artérií. Zaznamenali jsme pouze drobné změny uspořádání kolagenních a retikulárních vláken u periferních osvalených artérií a velkých vodivých artérií. Obrat kolagenu je pravděpodobně dostatečně rychlý proces, který může být pozměněn krátkodobým pozdním zásahem do 21denní hypoxie. Výsledek je v konsenzu a logickým pokračováním výsledků u studie 1. Procentuální zastoupení DLV odpovídá skupině H21, dokazuje to tedy, že terapie v posledních 4 dnech 21denní hypoxie nemá vliv na výsledný obraz morfologie hypoxické plicní hypertenze.

Změny v distribuci TBDMC a MMP13MC zachovávají trend ze 4denního pokusu studie 1. Hypoxie vedla ke snížení počtu detekovatelných žírných buněk. Terapie kromoglykátém sodným tento trend u 21denního pokusu nezměnila (H21 vs H21KZ vs H21KK). Výjimkou byl pouze stav u prealveolárních artérií, kde byl pokles u skupiny H21KZ zmírněn oproti skupinám H21 a H21KK, což může být vysvětleno rozdílným mechanismem a načasováním remodelací jednotlivých kategorií plicních artérií. Nález u skupiny N21KZ kopíroval obraz u skupiny N21 s výjimkou již uváděné, terapií kromoglykátém sodným indukované, fragmentace retikulárních vláken – viz diskuse N4K studie 1.

Morfometrické výsledky analýzy tloušťky jednotlivých kardiomyocytů a celého myokardu pravé komory srdeční, byl v souladu s předpokládaným funkčním efektem

terapie na hypoxickou plicní hypertenzi. Kardiomyocyty a myokard pravé komory byly u skupiny H21 a H21KK signifikantně zbytnělé oproti skupinám N21 a N21KZ. U skupiny H21KZ byla tato hypertrofie méně výrazná než u skupin H21 a H21KK, což je přímý morfologický důkaz toho, že i krátkodobá terapie kromoglykátem sodným v počátku 21denní hypoxie plicní hypertenzi omezí. Rozdílnou reaktivitu jednotlivých podvrstev myokardu jako u 4denního pokusu jsme u 21denního pokusu nezaznamenali.

Stejně jako u studie 1 jsme potvrdili pokles průměrné tělesné váhy potkanů vystavených hypoxii bez ohledu na terapii kromoglykátem sodným. Tedy že dominantním faktorem stresu je pro potkany hypoxie, nikoliv každodenní intraperitoneální aplikací kromoglykátu sodného (Lachmanová et al., 2005; Baňasová et al., 2008).

7. ZÁVĚR

Studie 1 dokázala, že remodelační změny plicních artérií, které se uskuteční během 4denní hypoxie se signifikantně projeví zvýšeným procentuálním zastoupením DLV, jakožto hlavních markerů hypoxické remodelace plicních artérií. Tyto přestavbové změny plicních artérií dostačují k rozvoji hypoxické plicní hypertenze, která pak dále vede k reaktivní hypertrofii pravé komory srdeční, a kardiomyocytů ve vrstvě endomyokardu a mesomyokardu. Stabilizace žírných buněk kromoglykátem sodným v průběhu 4denní hypoxie tyto remodelační změny výrazně omezuje, včetně minimalizace dopadu hypoxie na pravou komoru srdeční. Hypoxie způsobuje krom muskularizačních změn plicních artérií také změny ve vláknité složce mezibuněčné

hmoty. Některé tyto změny se odehrávají i přes, nebo dokonce i vlivem stabilizace žírných buněk proti degranulaci, a to buď cestou narušení bazální sekrece žírných buněk, nebo cestou uplatnění dalších hypoxií indukovaných faktorů plicní tkáně. Počet TBDMC a MMP13MC dle naší práce po expozici hypoxii v okolí plicních artérií klesá, terapie kromoglykátlem sodným tento pokles omezuje.

Studie 2 prokazuje, že pokračování 4denní hypoxie do 21denního pokusu vede k progresi již zahájených remodelací plicních artérií. Terapie kromoglykátlem sodným v prvních 4 dnech 21denní hypoxie tento postup omezuje a modifikuje, kdy zmírňuje nárůst v procentuálním zastoupení DLV, přesto nedovede zabránit rozvoji hypoxické plicní hypertenze, a s tím související hypertrofii kardiomyocytů a celého myokardu pravé komory srdeční. Vliv na změnu v distribuci TBDMC a MMP13MC tato terapie výrazně nemá. Terapie kromoglykátlem sodným v posledních 4 dnech 21denní hypoxie na výslednou remodelaci a hypoxickou plicní hypertenzi efekt nemá. Dochází však přesto k projevům terapie kromoglykátlem sodným na úrovni vláknité složky mezibuněčné hmoty. Tyto změny byly zaznamenány i u skupin normoxických, léčených kromoglykátlem sodným.

8. SOUHRN

V našem pokusu jsme potvrdili terapeutický efekt kromoglykátu sodného na hypoxické remodelace plicních artérií, vedoucí v rozvoj hypoxické plicní hypertenze. V průběhu těchto dějů předpokládáme kromě degranulačních produktů žírných buněk nezanedbatelný efekt dalších důležitých faktorů indukujících přestavbové změny, které se projevují dominantně po funkčním zablokování degranulace žírných

buněk. Doposud přehlížené, avšak výrazné změny velkých vodivých artérií v podobě zbytnění tunica media a tunica adventitia, hrají pravděpodobně svojí úlohu v utváření výsledné hypoxické plicní hypertenze. Na jejich progresi se však uplatňují výrazněji i jiné faktory než jen produkty žírných buněk. Terapie kromoglykátém sodným měla pouze minimální efekt na plicní artérie, jestliže byl podáván v závěru pokusu 21denní hypoxie. Jistý efekt terapie kromoglykátém sodným však byl zaznamenán i u léčených skupin normoxických. Analýza hypertrofie myokardu pravé komory srdeční, která může být považována za indikátor rozvoje hypoxické plicní hypertenze, potvrdila naše morfologické závěry ve struktuře plicních artérií potkana v průběhu terapie. Dále pak potvrdila funkční efekt terapie na rozvoj hypoxické plicní hypertenze.

9. SUMMARY

In our experiment, we confirmed a therapeutic effect of sodium cromoglycate administration on hypoxic remodeling of the lung pulmonary arteries, even when administration was at the beginning only. Nevertheless, there is suspicion of other important players during hypoxic remodeling except periarterial pulmonary mast cells due to some other morphological remodeling after significant mast cells stabilisation. On the contrary, so called large conduit arteries could also influence hypoxic pulmonary hypertension by their conspicuous medial and adventitial remodeling during hypoxia; nevertheless, the effect of mast cells products to these changes was only partial. Sodium cromoglycate has some little effect to rat lung arteries, even administrated in normoxical groups. Hypertrophy of right ventricular myocardium,

which can be considered as a marker of hypoxic pulmonary hypertension, confirmed our morphological results in structure of pulmonary arteries during therapy.

10. LITERATURA

1. Ball MK, Waypa GB, Mungai PT et al. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:314-24.
2. Baňasová A, Maxová H, Hampel V, Vízek M, Povýšilová V, Novotná J, Vajnerová O, Hniličková O, Herget J: Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. *Respiration* 2008, 76(1):102-107.
3. Bartelds B, van Loon RL, Mohaupt S, Wijnberg H, Dickinson MG, Boersma B, Takens J, van Albada M, Berger RM: Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Chest*. 2012 Mar;141(3):651-60.
4. Bartels K, Brown RD, Fox DL, Bull TM, Neary JM, Dorosz JL, Fonseca BM, Stenmark KR: Right Ventricular Longitudinal Strain Is Depressed in a Bovine Model of Pulmonary Hypertension. *Anesth Analg*. 2016 May;122(5):1280-6.
5. Campbell SE, Korecky B, Rakusan K: Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res*. 1991 Apr;68(4):984-96.
6. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P: Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*. 2015 Oct 1;128(19):3525-31.
7. Corno AF, Milano G, Morel S, Tozzi P, Genton CY, Samaja M, von Segesser LK: Hypoxia: unique myocardial morphology? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 May;127(5):1301-8.
8. Cruse G, Bradding P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol* 2016;778:125-38.
9. Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS et al. Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor- β . *Pulm Circ* 2011;1:259-68.
10. Dahal BK, Kosanovic D, Kaulen C, Cornitescu T, Savai R, Hoffmann J, Reiss I, Ghofrani HA, Weissmann N, Kuebler WM, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res*. 2011 May 2;12:60.
11. Davie NJ, Crossno JT, Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, Carpenter TC, Brunetti JA, McNiece IK, Stenmark KR: Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286(4):L668-L678.
12. Dinh W, Bansemir L, Fütth R, Nickl W, Stasch JP, Coll-Barroso M, Lapp H, Bufe A, Wolfertz J, Scheffold T, Lankisch M: Increased levels of laminin and collagen type VI may reflect early remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*. 2009 Jun;64(3):329-34.
13. Dorfmueller P, Humbert M: Progress in pulmonary arterial hypertension pathology: relighting a torch inside the tunnel. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(3):210–212.

14. Feltis BN, Wignarajah D, Reid DW et al. Effects of inhaled fluticasone on angiogenesis and vascular endothelial growth factor in asthma. *Thorax* 2007;62:314-9.
15. Fitzgerald J, Holden P, Hansen U: The expanded collagen VI family: new chains and new questions. *Connect Tissue Res.* 2013;54(6):345-50.
16. Gardi C, Calzoni P, Marcolongo P et al. Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: an in vitro study on fibroblast cultures. *Thorax* 1994; 49: 312–8.
17. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F: Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 2007, 87(1):69-98.
18. Heneberg P: Mast cells and basophils: Trojan horses of conventional Lin-Stem/progenitor cell isolates. *Curr Pharm Design* 2011, 17(34):3753-3771.
19. Herget J, Novotná J, Bíbová J, Povýšilová V, Vaňková M, Hampl V: Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 285(1):L199-208.
20. Herget J, Suggett AJ, Leach E, Barer GR: Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax.* 1978;33(4):468–473.
21. Hislop A, Reid L: New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol.* 1976 Oct;57(5):542-54.
22. Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol* 2003; 547(Pt 1):133–45.
23. Kelley JL, Chi DS, Abou-Auda W, Smith JK, Krishnaswamy G: The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease. *Mol Med Today* 2000, 6(8):304-308.
24. Lachmanová V, Hniličková O, Povýšilová V, Hampl V, Herget J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 2005, 77(2):175-182.
25. Leach E, Howard P, Barer GR: Resolution of hypoxic changes in the heart and pulmonary arterioles of rats during intermittent correction of hypoxia. *Clin Sci Mol Med.* 1977;52(2):153–162.
26. Majeed SK: Mast cell distribution in mice. *Arzneimittelforschung* 1994a, 44(10):1170-1173.
27. Majeed SK: Mast cell distribution in rats. *Arzneimittelforschung* 1994b, 44(3):370-374.
28. Mak KM, Sehgal P, Harris CK. Type VI Collagen: Its Biology and Value as a Biomarker of Hepatic Fibrosis. *Austin Biomark Diagn.* 2014;1(2).
29. Maxová H, Bačáková L, Lisá V, Novotná J, Tomášová H, Vízek M, Herget J: Production of proteolytic enzymes in mast cells, fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells cultivated under normoxic or hypoxic conditions. *Physiol Res* 2010, 59(5):711-719.
30. Maxová H, Novotná J, Vajner L, Vízek M, Vytášek R, Herget J: Hypoxia increases synthesis of metalloproteinases in isolated rat lung mast cells. *Physiol Res* 2002, 51(6):s69P.
31. Maxová H, Vasilíková M, Tkaczyk J, Vízek M: Disodium cromoglycate – mast cell degranulation blocker in the process of tissue remodeling. *Čs fyziol* 2010, 59(1):21-23.

32. Meyrick B, Hislop A, Reid L: Pulmonary arteries of the normal rat: the thick walled oblique muscle segment. *J Anat.* 1978 Feb;125(Pt 2):209-21.
33. Meyrick B, Reid L: Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. *Am J Pathol* 1979, 96:51-70.
34. Meyrick B and Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 1980;100:151-78.
35. Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmüller P, Price LC, Huertas A, Hammad H, Lambrecht B, Simonneau G, Launay J-M, Cohen-Kaminsky S, Humbert M: C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 2011, 184(1):116-123.
36. Naeije R, Brimioulle S, Dewachter L: Biomechanics of the right ventricle in health and disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ.* 2014 Sep;4(3):395-406.
37. Neale MG, Brown K, Hodder RW, Auty RM. The pharmacokinetics of sodium cromoglycate in man after intravenous and inhalation administration. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 22:373-82.
38. Nielsen BS, Egeblad M, Rank F, Askautrud HA, Pennington CJ, Pedersen TX, Christensen J, Edwards DF, Werb Z, Lund LR: Matrix metalloproteinase 13 is induced in fibroblasts in polyomavirus middle T antigen-driven mammary carcinoma without influencing tumor progression. *PLoS ONE* 2008, 3(8): e2959.
39. Novotná J, Herget J: Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res* 2002, 51(4):323-334.
40. Paddenberg R, Stieger P, von Lilien AL et al. Rapamycin attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy in mice. *Respir Res* 2007;8:15.
41. Pejler G, Rönnberg E, Waern I, Wernersson S: Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 2010, 115(24):4981-4990.
42. Pinsky MR: The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation. *Crit Care.* 2016 Sep 10;20:266.
43. Rose F, Grimminger F, Appel J et al. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J* 2002;16:1660-1.
44. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001;7:345-50.
45. Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* (1985) 2004;96:1173-7
46. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R: Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D34-41.
47. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF: Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Dec;297(6):L1013-32.
48. Swindle EJ, Metcalfe DD, Coleman JW: Rodent and human mast cells produce functionally significant intracellular reactive oxygen species but not nitric oxide. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):48751-9. Epub 2004 Sep 10.

49. Tabima DM and Chesler NC. The effects of vasoactivity and hypoxic pulmonary hypertension on extralobar pulmonary artery biomechanics. *J Biomech* 2010; 43: 1864–9.
50. Theoharides TC, Wang L, Pang X, Letourneau R, Culm KE, Basu S, Wang Y, Correia I: Cloning and cellular localization of the rat mast cell 78-kDa protein phosphorylated in response to the mast cell "stabilizer" cromolyn. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 294(3):810-821.
51. Tozzi CA, Thakker-Varia S, Yu SY, Bannett RF, Peng BW, Poiani GJ, Wilson FJ, Riley DJ: Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 18(4):497-510.
52. Vajner L, Vytášek R, Lachmanová V, Uhlík J, Konrádová V, Novotná J, Hampl V, Herget J: Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(5):383–391.
53. Voelkel NF and Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest* 2000; 106: 733–8.
54. Wilhelm J, Vaňková M, Maxová H, Šišková A: Hydrogen peroxide production by alveolar macrophages is increased and its concentration is elevated in the breath of rats exposed to hypoxia: relationship to lung lipid peroxidation. *Physiol Res* 2003;52:327-32.
55. Williams A, Heath D, Kay JM, Smith P: Lung mast cells in rats exposed to acute hypoxia, and chronic hypoxia with recovery. *Thorax.* 1977 Jun;32(3):287-95.
56. Witter K, Tonar Z, Schöpfer H. How many layers has the adventitia? - Structure of the arterial tunica externa revisited. *Anat Histol Embryol* 2016. doi: 10.1111/ahe.12239.
57. Xu X, Guan S, He B, Wang J. Active role of the predecidual-like zone in endometrial shedding in a mouse menstrual-like model. *Eur J Histochem* 2013;57:e25. doi: 10.4081/ejh.2013.e25.
58. Zrno AF, Milano G, Morel S, Tozzi P, Genton CY, Samaja M, von Segesser LK: Hypoxia: unique myocardial morphology? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 May;127(5):1301-8.
59. nepublikovaná data Žaloudíková M, Eckhardt A, Vytášek R, Uhlík J, Vajner L, Novotný T, Hampl V. Changes of collagen VI in tunica media of pulmonary vessels during exposure to hypoxia - new step in the pulmonary arterial remodeling. Odesláno do *European Respiratory Journal*.

11. SEZNAM PUBLIKACÍ

11.1 Publikace s IF vztahující se k tématu disertace (*in extenso*)

1. Novotný T, Uhlík J, Vajner L. Four-day pulse of sodium cromoglycate modulates pulmonary vessel wall remodeling during 21-day hypoxia in rats. *Experimental Lung Research*, 2018, 44 (přijato, v tisku). (IF 1,394)

2. Novotný T, Krejčí J, Malíková J, Švehlík V, Wasserbauer R, Uhlík J, Vajner L. Mast cell stabilization with sodium cromoglycate modulates pulmonary vessel wall remodeling during four-day hypoxia in rats. *Experimental Lung Research*, 2015, 41(5), 283-292. (IF 1,374)

3. Švehlík V, Novotný T, Krejčí J, Wasserbauer R, Malíková J, Vráblová K, Uhlík J, Vajner L. Administration of sodium cromoglycate in early phase of hypoxia restricts remodelling of the pulmonary arterial bed. *Eur.J.Med.Res.* 15 (Suppl.1), 2010: 162. (IF 1,130)

4. Novotný T, Krejčí J, Švehlík V, Wasserbauer R, Malíková J, Uhlík J, Vajner L. Effective stabilisation of mast cell granules by sodium cromoglycate leads to different redistribution of pulmonary toluidin-blue detectable mast cells during a hypoxia and posthypoxic recovery. *Eur.J.Med.Res.* 15 (Suppl.1), 2010: 158-159. (IF 1,130)

11.2 Publikace s IF nevztahující se k tématu disertace (*in extenso*)

1. Hvizdošová-Kleščová A, Uhlík J, Malina M, Vulterinová H, Novotný T, Vajner L: Remodeling of fetoplacental arteries in rats due to chronic hypoxia. *Exp Toxicol Pathol.* 2013, 65 (1-2), 97-103. (IF 2,781)

2. Krejčí J, Novotný T, Švehlík V, Wasserbauer R, Malíková J, Vráblová K, Uhlík J, Vajner L. Administration of sodium cromoglycate in early phase of hypoxia enables re-remodelling of the pulmonary arterial bed during the recovery phase. *Eur.J.Med.Res.* 15 (Suppl.1), 2010: 162-163. (IF 1,130)

11.3 Kapitoly v monografiích

Vajner,L., Uhlík,J., Novotný,T., Konrádová,V.: Lékařská histologie II. Mikroskopická anatomie. Karolinum, Praha, 2012, 174 s. ISBN 9788024621654